

SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET
I
MEDICINSKI FAKULTET

Hrvoje Vlašić

DOKAZIVANJE THC-a U MEDICINSKIM PRIPRAVCIMA I U BIOLOŠKIM
UZORCIMA

Diplomski rad

Akadska godina 2016./2017.

Mentorica:

prof. dr. sc. Davorka Sutlović, dipl. ing.

Komentorica:

dr. sc. Maja Veršić-Bratinčević, dipl. ing.

Split, svibanj 2017. god.

SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET
I
MEDICINSKI FAKULTET

Hrvoje Vlašić

DOKAZIVANJE THC-a U MEDICINSKIM PRIPRAVCIMA I U BIOLOŠKIM
UZORCIMA

Diplomski rad

Akadska godina 2016./2017.

Mentorica:

prof. dr. sc. Davorka Sutlović, dipl. ing.

Komentorica:

dr. sc. Maja Veršić-Bratinčević, dipl. ing.

Split, svibanj 2017. god.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Kemijsko-tehnološki fakultet i Medicinski fakultet
Integrirani preddiplomski i diplomski studij FARMACIJA
Sveučilište u Splitu, Republika Hrvatska

Znanstveno područje: Biomedicinske znanosti
Znanstveno polje: Farmacija
Nastavni predmet: Farmaceutska toksikologija
Tema rada je prihvaćena na sjednici Vijeća studija Farmacija te potvrđena na sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko-tehnološkog fakulteta i sjednici fakultetskog vijeća Medicinskog fakulteta
Mentor: prof. dr. sc. Davorka Sutlović
Pomoć pri izradi: dr. sc. Maja Veršić Bratinčević

DOKAZIVANJE THC-a U MEDICINSKIM PRIPRAVCIMA I U BIOLOŠKIM UZORCIMA

Hrvoje Vlašić, broj indeksa: 53

Sažetak:

Ciljevi istraživanja: Kvalitativno dokazati prisutnost THC-a i ostalih kanabinoida u medicinskim pripravcima i u biološkim uzorcima primjenom GC-MS metode, usporediti rezultate analize dobivene nakon pripreme uzoraka različitim ekstrakcijskim metodama (ekstrakcija čvrstom fazom, SPE, i ekstrakcija tekuće-tekuće, LLE) te utvrditi koja je metoda prikladnija za pripremu uzoraka pri analizi kanabinoida.

Ustroj istraživanja: eksperimentalna studija

Mjesto istraživanja: Kemijsko-toksikološki laboratorij Kliničkog odjela za sudsku medicinu Zavoda za patologiju, sudsku medicinu i citologiju, Kliničkog bolničkog centra u Splitu

Materijali i metode: Tri medicinska pripravka koji sadrže THC otopljena su i razrijeđena u kloroformu te analizirana GC-MS instrumentalnom metodom kako bi se utvrdio njihov sastav. Zatim su, koristeći te pripravke, pripravljena 24 biološka uzorka, od toga 12 uzoraka s mokraćom i 12 uzoraka sa serumom. Uzorci su podijeljeni u dvije istovjetne skupine i svaka je za analizu pripremljena različitom ekstrakcijskom metodom, ekstrakcijom čvrstom fazom (SPE) ili ekstrakcijom tekuće-tekuće (LLE). Uzorci su otopljeni u malom volumenu kloroforma i analizirani na GC-MS uređaju metodom koja omogućava istovremeno snimanje ukupnog ionskog kromatograma (TIC) u području od 40 – 600 m/z i snimanje samo odabranih iona (SIM).

Rezultati: U medicinskom pripravku 1 detektirano je prisustvo devet, a u medicinskim pripravcima 2 i 3 četrnaest kanabinoida. Kanabidiol (CBD) je detektiran u svim analiziranim uzorcima, dok je tetrahidrokanabinol (THC) detektiran u svim uzorcima medicinskih pripravaka 2 i 3. Analizom medicinskog pripravka 1, THC nije detektiran u nijednom ispitivanom uzorku mokraće kao ni u dva uzorka seruma pripremljena za instrumentalnu analizu LLE ekstrakcijskom metodom. Nakon pripreme uzoraka za analizu SPE metodom, analizom provedenom GC-MS tehnikom ukupno je detektirano 25 kanabinoida u šest uzoraka mokraće i 35 kanabinoida u šest uzoraka seruma, dok je nakon pripreme uzoraka za analizu LLE metodom ukupno detektirano 17 kanabinoida u šest uzoraka mokraće i 18 kanabinoida u šest uzoraka seruma. Uzorci pripremljeni za analizu SPE metodom dali su mnogo izraženije odzive na kromatogramu za kanabinoide od uzoraka pripremljenih za analizu LLE metodom.

Zaključak: Ekstrakcija čvrstom fazom (SPE) pokazala je veću učinkovitost u pripremi uzoraka za analizu, sa mnogo manjim ekstrakcijskim gubicima od ekstrakcije tekuće-tekuće (LLE), posebice kod analize kanabinoida iz uzoraka seruma. Nedostatak metode je u većem broju nečistoća koje u analizi mogu interferirati s analitom i otežati njegovu identifikaciju. Stoga je potrebno provesti detaljnija kvantitativna ispitivanja kako bi se utvrdilo u kojoj mjeri nečistoće interferiraju i da li to utječe na konačan rezultat analize.

Ključne riječi: THC, kanabinoidi, ekstrakcija čvrstom fazom, ekstrakcija tekuće-tekuće, GC-MS metoda

Rad sadrži: 67 stranica, 31 slika, 4 tablice, 49 literaturnih referenci

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav povjerenstva za obranu:

- | | |
|---|---------------------------|
| 1. izv. prof. dr. sc. Vedrana Čikeš Čulić | predsjednica Povjerenstva |
| 2. doc. dr. sc. Ivana Mudnić | član |
| 3. prof. dr. sc. Davorka Sutlović | član-mentor |

Datum obrane: (29. svibnja 2017.)

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u knjižnici Kemijsko-tehnološkog fakulteta Split, Rudera Boškovića 35 i Medicinskog fakulteta Split, Šoltanska 2.

BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

Faculty of Chemistry and Technology and School of Medicine
Integrated Undergraduate and Graduate Study of Pharmacy
University of Split, Croatia

Scientific area: Biomedical sciences
Scientific field: Pharmacy
Course title: Pharmaceutical toxicology
Thesis subject was approved by Council of Integrated Undergraduate and Graduate Study of Pharmacy, session no.____ as well as by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, session no.____ and Faculty Council of School of Medicine, session no.____.
Mentor: Davorka Sutlović, PhD, full prof.
Technical assistance: Maja Veršić Bratinčević, PhD

DETERMINATION OF THC IN MEDICAL CANNABIS AND BIOLOGICAL SAMPLES

Hrvoje Vlašić, index number: 53

Summary:

Objectives: Qualitative determination of THC and other cannabinoids in medical preparations and biological samples using GC-MS method, comparison of the results obtained after sample preparation with different extraction methods (Solid phase extraction, SPE, and Liquid-liquid extraction, LLE) and defining the more appropriate extraction method for sample preparation in cannabinoids analysis.

Design: Experimental study

Settings: Laboratory of toxicology, Department of pathology, forensic medicine and cytology, University Hospital of Split

Materials and methods: Three medical preparations which contain THC were dissolved and diluted in chloroform and analyzed with GC-MS instrumental method in order to determine their composition. Then, that preparations were used to make 24 biological samples with different concentrations of cannabinoids, 12 samples of urine and 12 samples of serum. Samples were divided into two identical groups and each group was prepared for analysis using different extraction method, solid-phase extraction or liquid-liquid extraction. Samples were dissolved in a small volume of chloroform and analyzed with GC-MS method using mode that simultaneously records total ion chromatogram (TIC) in the area of 40-600 m/z and single ion monitoring (SIM) scanning mode.

Results: There were nine cannabinoids detected in medical preparation 1 and fourteen cannabinoids detected in medical preparations 2 and 3. Cannabidiol (CBD) was detected in all analyzed samples, and tetrahydrocannabinol (THC) was detected in all samples made using medical preparation 2 and 3. THC was not detected in any urine samples made using medical preparation 1 as well as in two serum samples prepared for analysis with LLE extraction and made using the same preparation. GC-MS analysis detected the presence of a total of 25 cannabinoids in six urine samples and 35 cannabinoids in six serum samples after sample preparation by SPE extraction method and also 17 cannabinoids in six urine samples and 18 cannabinoids in six serum samples after sample preparation by LLE extraction method. Samples prepared for analysis by the SPE method gave more pronounced responses on the chromatograms compared to samples prepared for analysis by the LLE method.

Conclusion: SPE method showed greater efficacy in sample preparation for cannabinoids analysis of biological samples than liquid-liquid extraction, especially when analyzing serum samples. Disadvantage of SPE method is the greater amount of impurities present in the sample that can cause interferences with the analyte and make it more difficult to identify. Therefore, more detailed quantitative studies are needed to determine the extent to which the impurities interfere and whether that affects the final result of the analysis.

Key words: THC, cannabinoids, solid phase extraction, liquid-liquid extraction, GC-MS method

Thesis contains: 67 pages, 31 figures, 4 tables, 49 references

Original in: Croatian

Defence committee:

1. Vedrana Čikeš Čulić – PhD, associate prof.
2. Ivana Mudnić – PhD, assistant prof.
3. Davorka Sutlović - PhD- full prof.

Chair person
Member
Supervisor

Defence date: (May 29, 2017.)

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in Library of Faculty of Chemistry and Technology Split, Rudera Boškovića 35 and Library of School of Medicine, Šoltanska 2.

Sadržaj:

1.UVOD	1
1.1 Kanabinoidi	3
1.1.1. THC.....	7
1.2. Medicinski pripravci koji sadrže THC	9
1.2.1 Zakonska regulativa medicinske primjene kanabinoida	10
1.2.2. Medicinski pripravci koji sadrže THC u Hrvatskoj	11
1.3. Uzorkovanje za toksikološku analizu	12
1.3.1. Biološki uzorci	13
1.3.2. Nebiološki uzorci	13
1.4. Priprema uzoraka za kromatografsku analizu	14
1.4.1. Metode ekstrakcije	14
1.4.1.1. Ekstrakcija čvrstom fazom (SPE)	14
1.4.1.2. Ekstrakcija tekuće-tekuće (LLE).....	16
1.5. Instrumentalne tehnike za određivanje THC-a u medicinskim pripravcima i biološkim uzorcima	16
1.5.1. Plinska kromatografija	17
1.5.2. Masena spektrometrija	17
1.5.3. Plinska kromatografija sa spektrometrijom masa (GC-MS).....	18
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	20
3. MATERIJALI I METODE	22
3.1. Uzorci za analizu	23
3.2. Kemikalije	23
3.3. Postupci pripreme uzoraka za analizu	25
3.3.1. Postupak pripreme za analizu LLE metodom.....	25
3.3.2. Postupak pripreme za analizu SPE metodom	26
3.4. Instrumentalna analiza GC-MS metodom	27
3.4.1. Radni uvjeti GC-MS kromatografske kolone	28
4. REZULTATI	29

4.1. Kvalitativna identifikacija kanabinoida u medicinskim pripravcima.....	30
4.2. Kvalitativna identifikacija kanabinoida u biološkim uzorcima	35
4.3. Spektri masa tvari određenih u ispitivanim medicinskim pripravcima	44
5. RASPRAVA	48
6. ZAKLJUČCI	52
7. POPIS CITIRANE LITERATURE.....	54
8. SAŽETAK.....	60
9. SUMMARY.....	63
10. ŽIVOTOPIS.....	66

ZAHVALA

Zahvaljujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Davorki Sutlović i komentorici dr. sc. Maji Veršić Bratinčević što su me predano, strpljivo i stručno vodile u izradi ovog rada. Hvala vam na divnom vremenu provedenom u vašem laboratoriju kojeg ću se uvijek rado sjećati.

Hvala svim mojim studentskim kolegama i prijateljima koji su me uvijek poticali i povlačili sa sobom naprijed. Doći do ovoga bez njih bilo bi neizmjereno teže.

Hvala mojoj obitelji i rodbini koji su uvijek bili tu za mene, tješili me kad mi je bilo teško i motivirali me da nastavim dalje. Hvala za sve one male trenutke sreće koji su zapravo veliki.

Posebno hvala mojoj majci koja se svaki dan žrtvuje kako bi mi „izravnala staze“ na putu do cilja. Hvala ti što misliš na mene i dok spavaš i dok se budiš. Hvala ti što tvoja ljubav vječno traje i što zbog nje nikad nisam sam.

Na koncu, ovaj rad posvećujem svom ocu, čovjeku kojem svaki dan želim zahvaliti na ono premalo vremena što smo ga proveli zajedno, a kojem nikad nisam uspio reći tu riječ.

HVALA.

Ljekoviti pripravci biljnog podrijetla imaju dugu tradiciju primjene u prevenciji i liječenju bolesti diljem svijeta. Za razliku od većine medicinskih pripravaka kod kojih je poznat jedan aktivni sastojak odgovoran za terapijski učinak, kod pripravaka dobivenih iz biljnog materijala ukupni terapijski učinak rezultat je međudjelovanja više aktivnih komponenti koje mogu, ali i ne moraju biti poznate. Primijećeno je da, u slučaju pripravaka dobivenih iz konoplje, THC nije jedina djelatna tvar odgovorna za sve učinke pripravka, već ostali sastojci također mogu biti uzrok nekih učinaka ili modulirati učinak THC-a (1). Tako je, primjerice, otkriveno da kanabidiol (CBD) smanjuje anksioznost koju uzrokuje THC.

Prvi zapisi o upotrebi konoplje (*Cannabis sativa*, L., kanabis) javljaju se na području stare kineske civilizacije prije 4800 godina, stoga se smatra jednom od prvih kultiviranih biljaka. Zbog izrazite nutritivne vrijednosti sjemenke konoplje su se koristile u prehrani, dok su se ekstrakti listova i cvjetova s halucinogenim svojstvima koristili u religijskim ritualima, ali i kao sredstvo za stimulaciju apetita. Stoljećima je ova biljka uzgajana po svijetu zbog svojih vlakana, poznatih po izrazitoj čvrstoći, elastičnosti, dugotrajnosti i otpornosti na vodu. Ipak, konoplja je danas poznatija kao sirovina za marihuanu, drogu ilegalno korištenu u „rekreativne“ svrhe koja se dobiva iz suhih cvjetnih vrhova i lišća (sadržaj THC-a = 0,5-5%), i hašiš, termin za osušenu smolu kanabisa u kombinaciji sa prešanim cvjetovima (sadržaj THC-a = 2-20%) (2).

Do značajnog porasta medicinske primjene konoplje u Europi i Sjevernoj Americi dolazi sredinom 19. stoljeća nakon istraživanja koje je proveo irski liječnik William B. O'Shaughnessy. On je uspješno koristio ekstrakte iz listova i cvjetova konoplje za prevenciju konvulzija u epileptičara, terapiju boli kod reume i olakšavanje spazma kod tetanusa (3). Početkom 20. stoljeća dolazi do razvoja farmaceutske industrije i otkrivanja molekula koje su zaslužne za terapijski učinak (primjerice acetilsalicilne kiseline u aspirinu). Za razliku od aspirina čiji je sastav bio poznat, pripravci konoplje su, zbog kompleksnog sastava koji nije bilo moguće odrediti, ostali nestandardizirani i nestabilni, s neujednačenim odgovorom pacijenata na terapiju (4) pa su liječnici izgubili interes za njihovo propisivanje. Porast tzv. „rekreativne“ upotrebe konoplje dovela je do donošenja strogih zakonskih regulativa koja je rezultirala drastičnim smanjenjem proizvodnje prehrambene i medicinske konoplje (5). Ipak, otkrićem kanabinoida i mehanizma djelovanja javlja se svijest o njihovom terapijskom potencijalu te je danas proizvodnja medicinske konoplje jedna od najprogresivnijih grana farmaceutske industrije. Tako se npr. proizvodnja sjemenki konoplje u svijetu u razdoblju od

2010. do 2013. povećala za 92%, a listova i cvjetova korištenih u medicinske svrhe za čak 3000 % (6).

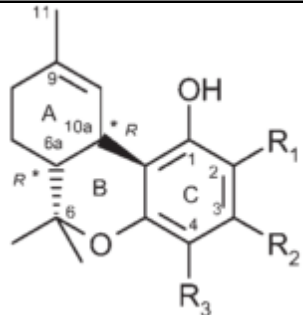
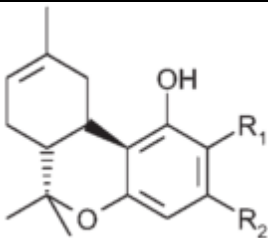
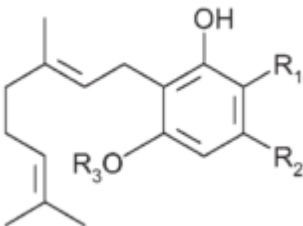
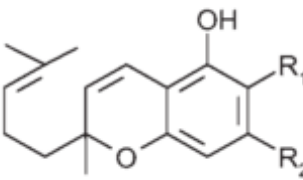
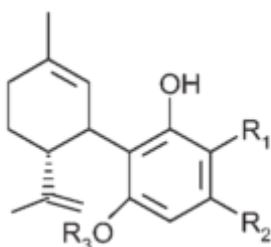
Pripravci konoplje su danas uglavnom indicirani kod mučnine i povraćanja povezanih s kemoterapijom, poremećaja prehrane (anoreksija, karcinomom ili HIV-om izazvana kaheksija), kronične boli, multiple skleroze, epilepsije i glaukoma. Upotreba preparata medicinske konoplje i dalje je vrlo ograničena zbog nedovoljno razvijenih ili nepostojećih zakonskih regulativa za njihovu primjenu te ona znatno varira od države do države. Dok je u Hrvatskoj propisivanje lijekova na bazi medicinske konoplje omogućeno tek 2015., u Kanadi i Nizozemskoj, primjerice, već su desetak godina na snazi vladini programi koji potiču propisivanje pripravaka konoplje. Prema podacima sakupljanima od 2003. do 2010. godine, u Nizozemskoj je na recept propisanu medicinsku konoplju koristilo između 5 i 8 ljudi na 100000 stanovnika, i to najčešće u terapiji kronične boli (53,6%), zatim u terapiji mučnine (15,5%), karcinoma (2,7%), glaukoma (2,2%) i terapiji AIDS-a (0,9%) (5).

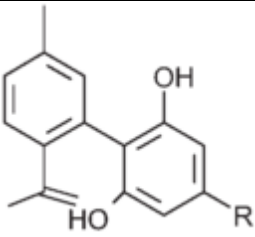
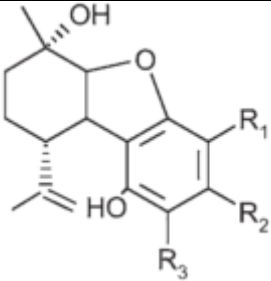
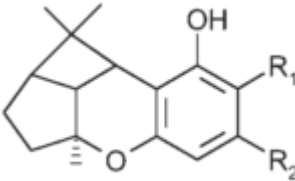
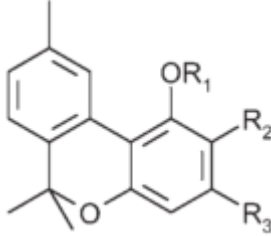
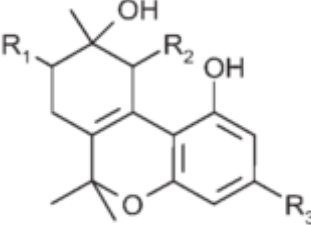
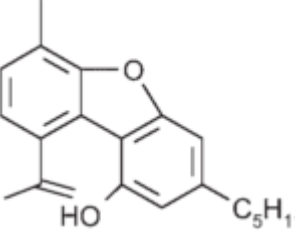
1.1 Kanabinoidi

Cannabis sativa sadrži više od 120 C21-terpenofenolnih konstituanata nazvanih fitokanabinoidi. Radi se, uglavnom, o nepolarnim molekulama, slabo topljivim u vodi, koje se u maloj količini i nepravilno apsorbiraju nakon oralne primjene, a vrlo dobro ukoliko su konzumirani inhalacijom (7). Kanabinoidi nisu ravnomjerno raspoređeni u biljci. Sadržaj kanabinoida najveći je u vršku cvijeta, nešto manji u lišću, minimalan u stabljici (THC<0,3%), dok korijen i sjemenke konoplje ne sadrže kanabinoide (8).

Kanabinoidi pronađeni u konoplji, na temelju kemijske strukture, podijeljeni su u 11 skupina (tablica 1).

Tablica 1. Pregled kemijskih struktura 11 skupina kanabinoida pronađenih u konoplji i ispitivanih farmakoloških svojstava glavnih predstavnika skupina (9).

SKUPINA KANABINOIDA	KEMIJSKA STRUKTURA	FARMAKOLOŠKA SVOJSTVA GLAVNOG PREDSTAVNIKA SKUPINE
Δ -9-tetrahidrokanabinol (Δ -9-THC)		Analgetik Antiinflamatorik Antiemetik Antioksidans Euforik
Δ -8-tetrahidrokanabinol (Δ -8-THC)		Kao Δ -9-THC (manje potentan)
kanabigerol (CBG)		Analgetik Antibiotik Antifungik Antiinflamatorik
kanabikromen (CBC)		Analgetik Antibiotsko Antifungalno Antiinflamatorik
kanabidiol (CBD)		Analgetik Anksiolitik Antiinflamatorik Antioksidans Antipsihotik Antispazmotik

kanabinodiol (CBND)		<i>nije poznato</i>
kanabielsoin (CBE)		<i>nije poznato</i>
kanabiciklol (CBL)		<i>nije poznato</i>
kanabinol (CBN)		Antibiotik Antiinflamatorik Antikonvulziv Sedativ
kanabitriol (CBT)		<i>nije poznato</i>
ostali kanabinoidi	 Dehidrokanabifuran (DCBF)	<i>nije poznato</i>

Osim najznačajnijeg Δ -9-tetrahidrokanabinola, otkriveno je da su kanabinol, Δ -8-THC i (-)-trans-delta-9-tetrahidrokanabivarin također sposobni aktivirati kanabinoidne receptore CB1 i CB2.

Kanabidiol (CBD), prvi kanabinoid izoliran iz konoplje, pokazuje veliki terapijski potencijal. Za razliku od THC-a nema psihotropni učinak te se proučavaju njegov protuupalni, antiemetički, sedacijski, antiepileptički i neuroprotektivni učinak. Također, CBD smanjuje intraokularni tlak, djeluje kao antioksidans te antagonizira psihotropni učinak THC-a zbog čega se kod korištenja kanabisa u medicinske svrhe obavezno sagledava omjer THC-a i CBD-a u biljci kako bi se umanjili neželjeni učinci THC-a.

Kanabigerol i kanabikromen pokazuju sedativni učinak, a proučava se potencijal kanabigerola kod smanjivanja intraokularnog tlaka, kao i njegova antitumorska i antibiotska svojstva (10).

Kvalitativna karakterizacija sastava konoplje uključuje određivanje omjera kanabinoida tetrahidrokanabinola i kanabidiola (THC/CBD) u biljci i pridruživanje određenom kemotipu. Fetterman i suradnici su 1971. godine razlučili dva kemotipa: medicinski (omjer THC/CBD veći od 1) i industrijski kemotip (omjer THC/CBD manji od 1). Dvije godine kasnije uveden je i treći kemotip u kojem je omjer THC/CBD približno jednak 1. Količina kanabinoida ovisi o brojnim biotičkim i abiotičkim čimbenicima uključujući spol i starost biljke, duljinu dana, temperaturu, UV intenzitet kojem je biljka izložena i tlo u kojem se uzgaja. Udio CBD-a i THC-a u zreloj ženskoj biljci može doseći do 10% suhe mase, dok je u mladim listovima ta količina manja od 1% (11).

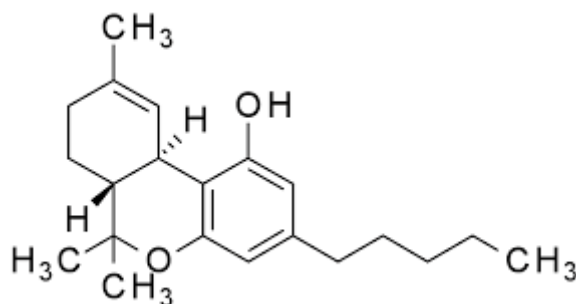
Utjecaj temperature je vrlo značajan zbog oblika u kojem je THC prisutan u biljci. Naime, pri nižim temperaturama THC se u kanabisu uglavnom nalazi kao tetrahidrokanabinolna kiselina (THCA). THCA, za razliku od fenolnog THC-a, ne posjeduje psihotropna svojstva te se za upotrebu u „rekreativne“ svrhe mora termičkom obradom (pušenje, kuhanje) dekarboksilirati do psihoaktivnog oblika THC-a. Omjer kiselinskog i fenolnog oblika THC-a u cvjetovima i listovima kanabisa uglavnom varira od 2:1 do 20:1 u korist kiseline. Tako je, na primjer, u biljkama izvorno uzgajanim u tropskim klimama Šri Lanke i Zambije omjer THCA/THC iznosio 2:1, dok se nakon prebacivanja u Ujedinjeno Kraljevstvo, u mnogo hladnije klimatsko područje, omjer THCA/THC u biljkama iz iste kulture povećao na 17:1 (7).

1.1.1. THC

Δ -9-tetrahidrokanabinol (Δ -9-THC ili samo THC, kemijska struktura na slici 1) je glavna psihoaktivna supstanca biljke Cannabis. Zbog tog svojstva predstavlja glavni izvor farmakoloških učinaka izazvanih konzumiranjem kanabisa, bilo da se radi o psihološkim učincima zbog kojih se zloupotrebljava u rekreativne svrhe ili terapijski korisnim učincima biljke.

Tetrahidrokanabinol spada u skupinu psihofarmaka s halucinogenim djelovanjem. Te se tvari, poznate i pod nazivom psihozomimetici, obično ne koriste kao lijekovi, već samo iznimno u psihoterapiji. Kao i mnogi drugi predstavnici te skupine, THC uzrokuje euforiju, anksioznost, pospanost, nemogućnost koncentracije, probleme s kratkotrajnim pamćenjem, gubitak ličnosti, ovisnost i toleranciju što „rekreativne“ korisnike često usmjeri prelasku ka jačim drogama (12).

Osim zloupotrebe i tzv. „rekreativnog“ konzumiranja, THC sve više pronalazi svoje mjesto u medicinskoj upotrebi. Njegova antiemetička svojstva (inhibira povraćanje) su se pokazala korisna u tretmanu bolesnika s karcinomom za vrijeme kemoterapije. Također, kako THC povećava apetit i smanjuje refleks povraćanja, počeo se koristiti kod anoreksije i drugih poremećaja u prehrani. Osim upotrebe kod inhibicije povraćanja, kanabis je indiciran u terapiji boli, glaukoma, mučnine, depresije i neuralgije. Terapeutska vrijednost fitokanabinoida je zabilježena i u liječenju multiple skleroze i u kontroli simptoma povezanih s AIDS-om (HIV/AIDS simptomi), a primjenjuje se i u liječenju alkoholizma i ovisnosti o opijatima (13).



Slika 1. Struktura Δ -9-tetrahidrokanabinola (14)

THC je vrlo lipofilan spoj, gotovo netopljiv u vodi, ali je stoga dobro topljiv u organskim otapalima, kao što su butan ili heksan (2). THC je termolabilna i fotolabilna molekula. Stajanjem na zraku dolazi do značajnog pada u njegovoj koncentraciji zbog oksidacijskog procesa kojim prelazi u kanabinol. U jednom od provedenih ispitivanja, dokazano je da se nakon 47 tjedana sadržaj THC-a u marihuani skladištenoj na 5 °C snizio se za 7%, a čak 13% kada je marihuana bila skladištena na temperaturi od 20 °C (15).

THC je izoliran kao spoj 1964. godine što je dovelo do otkrića endokanabinoidnog sustava u sisavaca, uključujući CB1 i CB2 kanabinoidne receptore, a zatim i do otkrića da ljudsko tkivo proizvodi molekule koje aktiviraju kanabinoidne receptore, nazvane endokanabinoidi, te da taj sustav unutar našeg organizma ima određenu protektivnu ulogu modulacijom neželjenih simptoma ili čak inhibicijom napredovanja nekih poremećaja (16). Svoju aktivnost THC ostvaruje vezivanjem na dvije vrste G-proteinom spregnutih kanabinoidnih receptora uklopljenih u staničnu membranu. Vezivanjem THC-a na ekstracelularni dio receptora, aktivira se signalni mehanizam unutar stanice i dolazi do niza reakcija uključujući inhibiciju adenil ciklaze, što smanjuje produkciju cikličkog adenozin monofosfata (cAMP-a), otvara kalijeve kanale uz zatvaranje kalcijevih kanala (17). CB1 receptori smješteni su uglavnom u mozgu i njihova aktivacija dovodi do psihotropnog učinka, dok su CB2 receptori smješteni u imunološkim stanicama (leukociti, slezena, krajnici). Kako aktivacija CB2 receptora ne utječe na psihi i cirkulaciju, istraživanja terapijske primjene kanabinoida su usmjerena ka otkrivanju selektivnih agonista CB2 receptora koji bi posjedovali analgetsko, protuupalno i antitumorsko djelovanje bez opioidnog učinka na pacijenta (8).

Apsorpcija THC-a u organizmu najbolja je nakon primjene inhalacijom. Njegovo se prisustvo u plazmi može detektirati već nekoliko sekundi nakon primjene, a vršna koncentracija se ostvaruje između 3. i 10. minute od primjene (18). Apsorpcija nakon oralne primjene je spora i nepravilna, a maksimalna koncentracija nastupa između 60 i 120 minuta od konzumacije. U prisustvu želučane kiseline izomerizira se u Δ -8-THC. Primjenom u obliku ulja ili sirupa degradacija se znatno smanjuje, a apsorpcija doseže i do 95%. Apsorbirani THC veže se u velikoj mjeri na proteine plazme (97-99%), uglavnom na lipoproteine, a manje na albumine. Brzo prelazi u tkivo te se akumulira u tkivima koja su jako prokrvljena, kao što je mozak, dok je u masnom tkivu znatno manje prisutan (7).

Glavni put eliminacije THC-a iz organizma je metabolizam. Kod ljudi je otkriveno više od 20 različitih metabolita od kojih su aktivni 11-hidroksi-THC i 8- β -hidroksi-THC. Vrijeme polurazgradnje THC-a iznosi 20-36 sati. Oko 70% THC-a se izluči u prva 72 sata, od toga 30% mokraćom, a 40% fecesom. Zbog značajne količine koja se izlučuje fecesom prisutno je enterohepatsko kruženje, odnosno resorpcija. Zbog svojstava topljivosti u mastima te akumulaciji u masnom tkivu, kod kroničnih konzumenata može se otkriti i nakon 27 dana (17).

1.2. Medicinski pripravci koji sadrže THC

Cannabis sativa L. sadrži više od 400 kemijskih spojeva među kojima je više od 100 kanabinoida (19) te je nemoguće kontrolirati sve sastojke prisutne u ljekovitom pripravku. Osnovno mjerilo kvalitete pripravka su koncentracije i omjer koncentracija dvaju terapijski najznačajnijih i najzastupljenijih kanabinoida u konoplji: THC-a i CBD-a. Osim njih, mjere se i koncentracije drugih zastupljenijih kanabinoida, ali i nekih drugih komponenata, kao što su karotenoidi. Konzistencija biljnog materijala se ostvaruje održavanjem genetski stabilne populacije biljaka uzgajanih u jednakim uvjetima (20).

Vršni dijelovi cvjetova i/ili listovi se ekstrahiraju, a zatim se ekstrakti zagrijevaju kako bi se tetrahidrokanabinolna (THCA) i kanabidiolna kiselina (CBDA) preveli u aktivne oblike (THC i CBD). Tako dobiveni ekstrakti se zatim formuliraju u neki ljekoviti oblik, ovisno o namijenjenom putu primjene. Ukoliko se radi o peroralnom načinu primjene, lijek se mora zaštititi unutar lipidnog nosača kako bi se spriječila želučana razgradnja i smanjili učinci metabolizma prvog prolaska. Postoje i drugi oblici pripravaka namijenjeni za inhalacijsku, nazalnu, sublingvalnu ili rektalnu primjenu (21).

Prvi medicinski pripravak na bazi kanabisa koji se pojavio u Europskoj Uniji je nabixsimol (Sativex®), odobren krajem 2010. godine u Ujedinjenom Kraljevstvu kao pomoćna terapija za olakšavanje spastičnosti kod multiple skleroze te kao dodatak opioidnim analgeticima u liječenju boli uzrokovanoj karcinomom. Pripravak sadrži dva glavna kanabinoida u omjeru približno 1:1 (THC, 27 mg/mL; CBD, 25 mg/mL). Na tržište dolazi u obliku spreja s pumpicom (100 μ L po potisku spreja) namijenjen sublingvalnoj primjeni (22). Lijek se izdaje na recept u početnoj dozi od jednog potiska dnevno, te se doza postupno povećava do optimalnog učinka, odnosno, do maksimalno 12 potisaka spreja na dan (23).

Osim pripravaka medicinskog kanabisa, na tržištu postoje još dva pripravka THC-a. Radi se o potpuno sintetičkim oblicima THC-a: dronabinolu i nabilonu. Dronabinol (Marinol®) je sintetički Δ -9-THC otopljen u ulju sezama i kapsuliran u mekim, želatinoznim kapsulama. Nabilon je sintetički analog THC-a sa slabijim afinitetom vezanja na CB1 i CB2 receptore. Odobreni su 1985. u SAD-u za suzbijanje mučnine i povraćanja kod pacijenata na kemoterapiji koji nisu adekvatno odgovorili na konvencionalnu terapiju. 1992. je dronabinol odobren za liječenje anoreksije povezane s gubitkom težine u pacijenata zaraženih HIV-om (24).

1.2.1 Zakonska regulativa medicinske primjene kanabinoida

Tijekom 20. stoljeća, primjena konoplje privlači sve više pravnih pitanja pa je, nakon brojnih pokušaja ograničavanja primjene tih pripravaka, 1961. godine donesena Jedinstvena konvencija UN-a o opojnim drogama koja je psihoaktivne supstance svrstala u četiri nivoa, od kojih je četvrti bio najstrože reguliran. Cvjetni vrhovi kanabisa smješteni su u četvrti nivo, kao droga s vrlo visokim rizikom zloupotrebe, velikom opasnosti za javno zdravlje, a vrlo malom terapijskom vrijednosti. Ekstrakti i tinkture našli su se u prvom nivou te su bili dozvoljeni za upotrebu u medicinske i znanstvene svrhe (5).

1985. godine sintetski analozi THC-a za oralnu primjenu, dronabinol i nabilon, dopušteni su kao antiemetska terapija u onkoloških bolesnika koji ne odgovaraju na konvencionalnu terapiju, a 1992. godine dronabinol je indiciran za liječenje anoreksije povezane s gubitkom težine u bolesnika s AIDS-om (25).

Nabiximol, odobren 2010. godine, nalazio se prvotno u prometu u Njemačkoj, Austriji, UK, Danskoj, Kanadi i Švicarskoj. U siječnju 2015., prema evidenciji Ureda za suzbijanje zlouporabe droga, 12 zemalja Europske unije omogućilo je upotrebu kanabisa u medicinske svrhe: Češka, Finska, Rumunjska, Italija, Španjolska, Nizozemska, Francuska, Austrija, Portugal, Njemačka, Velika Britanija i Slovenija. Svaka od navedenih zemalja je potpisnica Jedinstvene konvencije UN-a o opojnim drogama iz 1961., Konvencije UN-a o psihotropnim tvarima iz 1971., Konvencije UN-a protiv nedozvoljenoga prometa psihotropnim supstancama iz 1988., jednako kao i Republika Hrvatska. Konvencije su sastavljene sa svrhom suzbijanja zlouporabe droge i ujednačavanja pristupa ovom problemu na globalnoj razini. U samoj preambuli konvencije izričito dopuštaju uporabu droga u

medicinske svrhe, a štoviše Konvencija iz 1971. jasno propisuje da „uporaba droge u medicinske svrhe jest nužna i ne smije biti bezrazložno ograničena“ (26).

Radna skupina Ministarstva zdravlja Republike Hrvatske za medicinsku marihuanu je u ljeto 2015. izašla u javnost s prijedlozima simptoma za koje bi uporaba medicinske marihuane bila opravdana i za koje postoji dovoljno informacija dobivenih kliničkim istraživanjima. Tako je, nakon provedene javne rasprave, 15. listopada 2015. godine na snagu stupio *Pravilnik o mjerilima za razvrstavanje lijekova te o propisivanju i izdavanju lijekova* na recept kojim je Hrvatska postala 13. zemlja Europske unije u kojoj se omogućilo propisivanje lijekova baziranih na indijskoj konoplji (27). Stupanjem Pravilnika na snagu, lijekove koji sadržavaju THC ili nabilon mogu prepisivati izabrani liječnici u djelatnosti opće/obiteljske medicine te zdravstvene zaštite predškolske djece i zdravstvene zaštite žena po preporuci doktora medicine specijalista neurologije, internističke onkologije, onkologije i radioterapije, infektologije i specijalista pedijatra sa subspecijalizacijom iz neuropedijatrije i to na neponovljivi recept na teret bolesnika s obzirom da se radi o pomoćnoj terapiji. Liječnik na recept smije propisati količinu potrebnu za liječenje najviše do 30 dana, a ukupna količina propisanog THC-a ne smije biti veća od 7,5 g. Pripravci koji sadrže navedene psihoaktivne tvari mogu se propisivati za ublaživanje tegoba kod multiple skleroze, karcinoma, epilepsije i AIDS-a (28).

1.2.2. Medicinski pripravci koji sadrže THC u Hrvatskoj

Prvi medicinski preparat kanabisa u Hrvatskoj zaprimljen je u Imunološkom zavodu 14. lipnja 2016. godine. Radilo se o lijeku kanadskog proizvođača Lafitte Ventures, Ltd dba Tilray. Lijek je sadržavao kapsule ispunjene uljem kanabisa proizvedenim tehnikama ekstrakcije indijske konoplje uz dodatak nosivog ulja na biljnoj bazi, a bio je dostupan u dvije formulacije:

- kapsule s tekućim punjenjem Tilray Cannabis Sativa s 5,0 mg THC-a/ 5,0 mg CBD-a po kapsuli
- kapsule s tekućim punjenjem Tilray Cannabis Sativa s 2,5 mg THC-a/ 2,0 mg CBD-a po kapsuli

4. kolovoza 2016. godine dolazi do povlačenja obe formulacije iz prometa zbog neispravnosti u kakvoći lijeka klase III (variranje mase proizvoda uzrokovano oštećenjem kapsula tijekom transporta). 7. studenog 2016. godine u Hrvatsku je stigla nova pošiljka

lijeka, ovaj put u obliku ulja u bočicama od 25 mL s dozatorom koja zamjenjuje povučene kapsule s tekućim punjenjem. Lijek se izdaje na liječnički recept i dostupan je u dvije formulacije:

- Ulje kanabisa u bočicama, Tilray Drops (Cannabis Sativa Oil) 5,0 mg THC-a/5,0 mg CBD-a po 1 mL ulja
- Ulje kanabisa u bočicama, Tilray Drops (Cannabis Sativa Oil) 2,5 mg THC-a/2,5 mg CBD-a po 1 mL ulja (29)

21. lipnja 2016. godine Hrvatska ljekarnička komora izdala je upute za izradu magistralnog pripravka koji sadrži THC/CBD koristeći tada još dostupan kapsuliran oblik lijeka. Prilikom izdavanja magistralnog pripravka na bazi kanabisa u ljekarni, ljekarnik treba pripremiti i odvojiti određeni broj kapsula u količini i dozi navedenoj na receptu izabranog doktora primarne zdravstvene zaštite, temeljem preporuke liječnika specijaliste. Doktor medicine na recept za magistralni pripravak obavezan je propisati: količinu THC-a za pojedinačnu dozu, vrstu biljne droge i biljnog pripravka iz kojeg će se izraditi magistralni pripravak, broj pojedinačnih doza, ljekoviti oblik te doziranje i način uporabe. Magistralni pripravak izdaje se u staklenoj boci tamne boje, sa širokim grlom, na koju se stavlja bijela signatura s podacima sukladno članku 47. *Pravilnika o mjerilima za razvrstavanje lijekova te o propisivanju i izdavanju lijekova na recept.* (27).

1.3. Uzorkovanje za toksikološku analizu

Jedan od najvažnijih postupaka toksikološke analize, koji znatno utječe na rezultat analize, način je uzimanja uzoraka, odnosno uzorkovanje (30). Svaki uzorak je dio sustava namijenjen da pruži informaciju o sustavu i često služi kao osnova za mišljenje o sustavu ili njegovom radu. Uzorci za toksikološku analizu mogu biti biološki i nebiološki. Biološki uzorci su tkiva i biološke tekućine najčešće dobiveni iz ljudskog organizma, dok nebiološki uzorci zapravo predstavljaju sve ostale uzorke (primjerice, uzorak vode, tla, ili zraka), a među koje spadaju i u ovom radu analizirani uzorci medicinskih pripravaka kanabisa.

1.3.1. Biološki uzorci

U toksikološkim analizama živih osoba najčešće se analiziraju biološke tekućine (u 98% slučajeva to su mokraća, krv, slina i želučani sadržaj), ostalo otpada na kosu, nokte i stolicu (30). Određivanje sredstava ovisnosti i droga u biološkim uzorcima otežano je zbog interferencija s drugim biološkim molekulama prisutnim u ispitivanom uzorku i metabolitima ostalih tvari unesenih u organizam (hrana, piće, lijekovi).

Krv je najčešće korišten biološki uzorak u kliničkoj i poslijesmrtnoj toksikološkoj analizi. Od velikog je značaja za detekciju, a osobito za kvantitativno određivanje i interpretaciju koncentracije lijekova i droga. Koncentracija droge u krvi pokazuje najbolju korelaciju s učincima na organizam pa se uzorci krvi najčešće koriste za kvantitativno određivanje i temelj su definiranja farmakoloških učinaka i određivanja toksičnih doza droga (31). Nedostatak krvi u odnosu na ostale uzorke je niska koncentracija droge pa zahtijeva specifične analitičke tehnike.

Mokraća se smatra najprikladnijim uzorkom za detekciju droge u živih osoba jer je koncentracija droge i njenih metabolita u tom uzorku najveća, a samim time i najlakša za identifikaciju. Mokraća sadrži mali udio endogenih tvari pa je vjerojatnost za interferenciju s analitom od interesa znatno manja nego u uzorku krvi. Stoga je mokraća često korišten uzorak u analizama na prisutnost opojnih droga i alkohola (32). Najveći nedostatak uzoraka mokraće je jednostavna mogućnost manipulacije pri analizi na prisutnost droga, zbog toga se postupak uzimanja uzorka mokraće treba provoditi u strogo kontroliranim uvjetima (33).

1.3.2. Nebiološki uzorci

Analiza nebioloških uzoraka najčešće se koristi za identifikaciju, određivanje kvantitativnog sastava, stupnja čistoće i stabilnosti nekog sustava ili za ispitivanja fizikalno-kemijskih svojstava tvari u sustavu. Nebiološke uzorke, za razliku od bioloških, uglavnom karakteriziraju manje molekule, kao i manja kompleksnost sustava pa su interferencije među molekulama rjeđe. Zato, kod analize uzoraka medicinskih pripravaka, za razliku od bioloških uzoraka, često nije potrebno provoditi separacijske metode kao postupak pripreme za analizu. Takva analiza je stoga jeftinija i jednostavnija (34).

1.4. Priprema uzoraka za kromatografsku analizu

Prije instrumentalne analize odgovarajućom analitičkom metodom potrebno je izolirati spojeve od interesa iz biološkog, a često i iz nebiološkog materijala. Biološki materijal je kompleksnog sastava i endogene komponente u takvom materijalu mogu interferirati s analitom pa ih je potrebno ukloniti prije analize. Također, koncentracije traženih tvari često su vrlo niske pa ih je potrebno dodatno koncentrirati kako bi mogle biti detektirane u analizi. U pripremi bioloških uzoraka najčešće se koriste različite ekstrakcijske metode, ali i neki drugi postupci, kao što su hidroliza ili derivatizacija uzorka (35).

1.4.1. Metode ekstrakcije

Ekstrakcija je ravnotežni proces odvajanja jedne ili više komponenti iz smjese na temelju različite razdiobe komponenata između dva otapala koja se međusobno ne miješaju. Ekstrakcija često prethodi postupku kromatografske analize kako bi se iz biološkog uzorka izolirao spoj od interesa. Naime, biološki materijal je uglavnom kompleksan, a koncentracija traženog spoja niska. Endogene komponente u biološkom materijalu mogu interferirati s analitom te ih se, stoga, ekstrakcijom prije analize uklanja, a analit se dodatno koncentrira (35).

Ekstrakcijske metode koje se najčešće koriste za pripremu bioloških uzoraka :

- Ekstrakcija čvrstom fazom (engl. *Solid phase extraction, SPE*)
- Ekstrakcija tekuće-tekuće (engl. *Liquid-liquid extraction, LLE*)

1.4.1.1. Ekstrakcija čvrstom fazom (SPE)

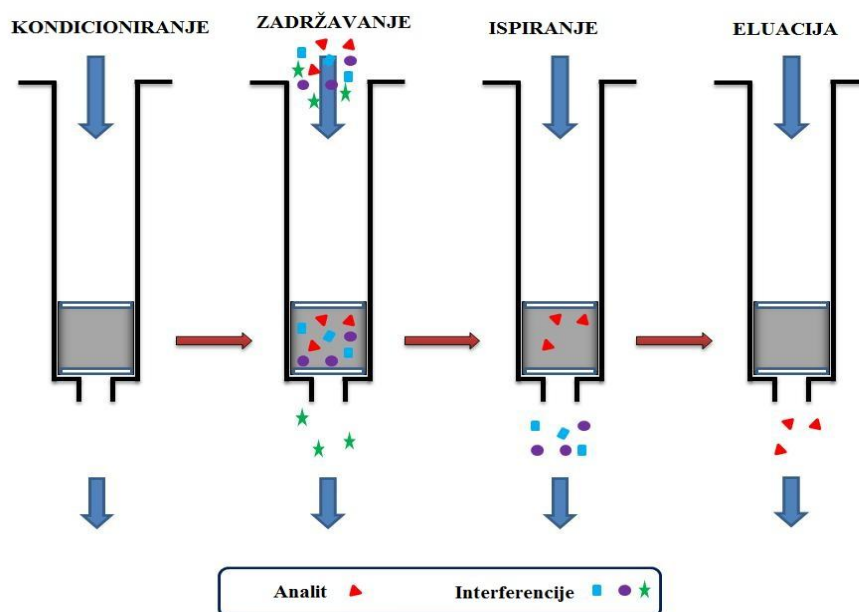
Ekstrakcija čvrstom fazom koristi se za odjeljivanje organskih spojeva iz biološkog materijala na temelju njihovih različitih afiniteta za stacionarnu fazu u kolonama. Analit otopljen u otapalu (tekuća faza) pokazuje veći afinitet za sorbens (čvrsta faza) pa kad uzorak prođe kroz kruti nosač, analit se koncentrira na površini sorbensa dok ostatak uzorka slobodno prolazi kroz kolonu (36).

Postupak ekstrakcije čvrstom fazom obuhvaća nekoliko koraka (slika 2). Kolona se prvo kondicionira organskim otapalom kako bi došlo do oslobađanja vezanih funkcijskih

skupina, aktiviranja ugljikovodikovih lanaca i uklanjanja organskih ostataka s nosača. Nakon toga dodaje se pripremljeni uzorak i propušta pod laganim vakuumom. Nosač se zatim ispiru kako bi se uklonili ostaci otapala i druge nečistoće, a potom se analit eluira s nosača otapalom iznimno velike elucijske moći (afinitet za analit veći od afiniteta sorbensa) (37). Pri tome je važno napomenuti da se polarni analiti zadržavaju na polarnim nosačima koji se ispiru vodenim, a eluiraju organskim otapalima (normalna faza), dok se nepolarni analiti zadržavaju na nepolarnim nosačima koji se ispiru organskim, a eluiraju vodenim otapalima (reverzna faza).

U početku se za nosače koristio prirodni materijal kao što je silikagel, a danas su komercijalno dostupni razni materijali niske specifičnosti (kemijski vezani silikati, porozni polimeri, nosači na bazi ugljika) ili visoko specifični nosači za određeni kemijski spoj ili funkcionalnu skupinu (ionski izmjenjivači, nosači ograničenog pristupa, makrociklički nosači, imunoafinitetni nosači, molekularni tiskani polimeri) (38).

Prednosti ove metode uključuju veću selektivnost (uporaba brojnih nosača i otapala za različite aplikacije), čišće ekstrakte (selektivno koncentriranje i eluiranje spojeva od interesa), lako rukovanje kolonama i potencijalnu automatizaciju procesa, a smanjena je i potrošnja organskih otapala. Nedostaci su nestabilnost silika gela u alkalnoj sredini (treba ga izbjegavati kod otopina s visokim pH) i mogućnost začepjenja pora krutog nosača (preporučljivo je filtrirati ili centrifugirati uzorke prije apliciranja na kolonu) (35).



Slika 2. Priprema uzorka metodom ekstrakcije čvrstom fazom (SPE)

1.4.1.2. Ekstrakcija tekuće-tekuće (LLE)

Ekstrakcija tekuće-tekuće je postupak kojim se otopljena tvar raspodjeljuje između dviju tekućina koje se ne miješaju. Analit se razdjeljuje između dviju faza na temelju različite topljivosti i postiže ravnotežu. Primjerice, hidrofobni spojevi su slabo topljivi u vodenom uzorku (mokraća, serum) te se mogu lako ekstrahirati u organsko otapalo.

Vrlo bitan čimbenik koji utječe na raspodjelu analita između tekućih faza je pH vrijednost otopina. Kiseli spojevi su, uglavnom, netopljivi u kiselom mediju pa se iz takvih otopina mogu ekstrahirati. Ukoliko je pH medija za barem 2 pH jedinice niži od pKa analita, analit će se nalaziti gotovo potpuno u neioniziranom obliku i takav prelaziti iz vodenog okruženja u organsko otapalo. Uvjeti za ekstrakciju kiselih spojeva najbolje se ostvaruju kiselim puferima (fosfatni ili acetatni) u omjeru otapalo prema uzorku 5:1 (35).

LLE je jedna od najčešće korištenih metoda pripreme uzorka jer je relativno jednostavna i brza. Koristi se za hitne analize uzoraka za određivanje nepoznatih analita, te za analize s više analita različitih fizikalno-kemijskih svojstava. Najveći nedostaci metode su niska selektivnost, ograničen broj otapala koji se međusobno ne miješaju te potrošnja velikih količina organskih otapala (39). Dodatno pojednostavnjenje metode postiže se komercijalnim sustavima kojih je sve više na tržištu.

1.5. Instrumentalne tehnike za određivanje THC-a u medicinskim pripravcima i biološkim uzorcima

Za određivanje prisustva sredstava ovisnosti i droga u medicinskim pripravcima i u biološkim uzorcima najčešće se koriste razne kromatografske tehnike. Kromatografske metode predstavljaju analitičke tehnike kojima se omogućuje odjeljivanje, identifikacija i kvantitativno određivanje kemijskih sastojaka u kompleksnim maticama uzoraka (40). Sve kromatografske metode karakterizira prisustvo mobilne i stacionarne faze, ovisno o vrsti kromatografske tehnike. Uzorak, nošen mobilnom fazom, prolazi kroz stacionarnu fazu, a razdvajanje se temelji na različitoj brzini gibanja komponenti nošenih mobilnom fazom, odnosno, različitom afinitetu analita prema stacionarnoj fazi.

Kromatografske tehnike kojima se mogu identificirati i kvantificirati analiti u složenim matricama uzoraka su tekućinska kromatografija visoke učinkovitosti (engl. *High performance liquid chromatography, HPLC*), plinska kromatografija (engl. *Gas chromatography, GC*) te vezane tehnike plinske kromatografije sa spektrometrom masa (engl. *Gas chromatography – mass spectrometry, GC-MS*) i tekućinske kromatografije sa spektrometrom masa (engl. *Liquid chromatography – mass spectrometry, LC-MS*) (41).

1.5.1. Plinska kromatografija

Plinska kromatografija (GC) najčešće je korištena tehnika za kvalitativnu i kvantitativnu analizu spojeva koji isparavaju na radnim temperaturama kolone (do 300 °C), a da pritom ne dođe do njihove razgradnje (42). Radi se o tipu kolonske kromatografije u kojoj je stacionarna faza tekućina ili krutina imobilizirana na inertnom nosaču stijenke kapilarne kolone, a mobilna faza je kemijski inertan plin (koristi se helij, dušik, vodik, argon i ugljikov dioksid). Uzorak se prvo uparava, a zatim injektira na početku kolone i potiskuje kroz nju nošen mobilnom fazom pod povišenim tlakom.

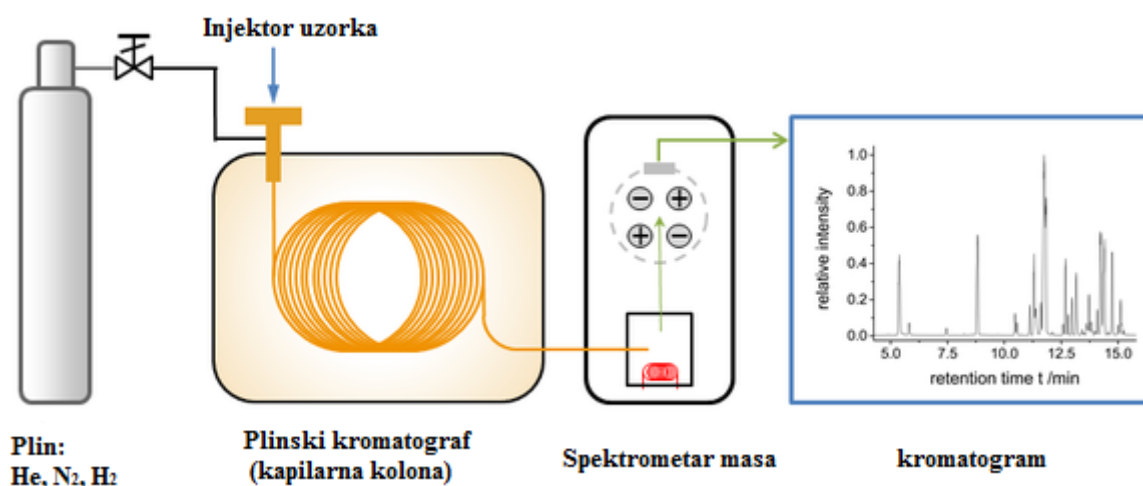
Sastojci uzorka se na temelju različitih fizikalno-kemijskih svojstava razdvajaju na koloni i u različitom vremenu detektiraju na detektoru. Osjetljivost detektora mjeri se odnosom visine pika-S (engl. *Signal*) i visine bazne linije-N (engl. *Noise*) i označava omjerom S/N. Svaki detektor ima određeno linearno radno područje u kojem je količina analita razmjerna dobivenom signalu (43).

1.5.2. Masena spektrometrija

Masena spektrometrija je instrumentalna metoda identifikacije kemijskih struktura kroz dva procesa: ionizaciju uzorka i razdvajanje fragmenata djelovanjem magnetskog polja (44). Uzorak se prvo ionizira pri čemu nastaju molekulski ioni i nabijeni fragmenti koji potom ulaze u magnetski analizator gdje im se pod djelovanjem jakog magnetskog polja može zakrenuti putanja ovisno o omjeru mase i naboja (m/z). Tako ionizirani spojevi dolaze na detektor koji registrira nastali električni signal u obliku omjera m/z koji se zapisuje na pisaču (41).

1.5.3. Plinska kromatografija sa spektrometrijom masa (GC-MS)

Plinska kromatografija sa spektrometrijom masa (engl. *Gas chromatography - mass spectrometry*, *GC-MS*) predstavlja „zlatni standard“ u kvantitativnoj i kvalitativnoj forenzičnoj i kliničkoj analizi medicinskih pripravaka, sredstava ovisnosti i bioloških uzoraka. Predstavlja analitičku metodu u kojoj se objedinjuju značajke plinsko-tekućinske kromatografije (odjeljivanje smjesa, kvantifikacija sastojaka) i spektrometrije masa (identifikacija pojedinačnih sastojaka) (44). Sprega kromatografskih i spektrometrijskih tehnika povećava njihovu pojedinačnu specifičnost i osjetljivost te tako omogućava najučinkovitije razdvajanje, identifikaciju i kvantifikaciju hlapljivih i poluhlapljivih tvari u biološkim uzorcima.



Slika 3. Shematski prikaz osnovnih dijelova vezane GC-MS tehnike (45)

Karakteristični podaci dobiveni plinskom kromatografijom su vrijeme zadržavanja, (značajno za identifikaciju sastojka) i površina ispod pika (proporcionalna količini sastojka), a spektrometrom masa dobiva se spektar masa jedinstven za svaku tvar (prikazuje relativnu zastupljenost nastalih fragmenata u ispitivanom spoju) pa se često naziva i „otiskom prsta“ za kemijske spojeve. Usporedbom dobivenog spektra fragmentacije s referentnim spektrima koje pružaju baze spektara (takozvane biblioteke), kao što su NIST (engl. *National Institute of Standards and Technology*), EPA (engl. *Environmental Protection Agency*), Wiley ili

SWGDRUG (engl. *Scientific Working Group for the Analysis of Seized Drugs*), strukturalna identifikacija određenog sastojka je znatno olakšana.

Prednosti GC-MS metode su visoka osjetljivost, preciznost, pouzdanost, selektivnost i male količine uzoraka potrebnih za analizu. Veliki nedostatak predstavlja visoka temperatura injektora zbog čega se termički labilne tvari mogu razgraditi prilikom prolaska kroz kolonu plinskog kromatografa pa se ovom metodom analiziraju samo termostabilni spojevi koje je moguće dovesti u plinovito stanje pri temperaturama nižim od 400 °C. Hlapljivost i termostabilnost komponenti uzorka može se povećati postupkom kemijske derivatizacije. Osim spomenutog, nedostatak metode predstavlja dugotrajan i skup postupak pripreme, posebice pri kvantitativnim analizama (46).

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Ciljevi ovog rada su:

1. Kvalitativno dokazati prisutnost THC-a i ostalih kanabinoida u medicinskim pripravcima primjenom GC-MS metode.
2. Dokazati prisutnost THC-a i ostalih kanabinoida u biološkim uzorcima mokraće i seruma primjenom GC-MS metode.
3. Usporediti rezultate analize dobivene nakon pripreme uzoraka različitim ekstrakcijskim metodama, (ekstrakcija čvrstom fazom i ekstrakcija tekuće-tekuće) te utvrditi koja je metoda prikladnija za pripremu uzoraka koji sadrže kanabinoide.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Uzorci za analizu

U ovom su istraživanju korištena tri različita medicinska pripravka koji sadrže THC. Prvotno su analizirani samostalno, za utvrđivanje njihovog sastava. Biološki uzorci mokraće i seruma dali su rezultat negativan na prisustvo sredstava ovisnosti i lijekova. Za dokazivanje prisustva THC-a i ostalih kanabinoida, u biološke uzorke dodani su volumeni 25 i 50 μL medicinskih pripravaka 1, 2 i 3, te su tako pripremljena 24 biološka uzorka (prikazano u tablici 2).

3.2. Kemikalije

Za provođenje ovog istraživanja korištene su slijedeće kemikalije:

Acetatni pufer (pH=4,0), Merck, Darmstadt, Njemačka

Diklormetan, p.a., Merck, Darmstadt, Njemačka

Etil acetat, p.a., Merck, Darmstadt, Njemačka

Fosfatni pufer (pH=6,90), Merck, Darmstadt, Njemačka

Kloroform, p.a., Merck, Darmstadt, Njemačka

Metanol, p.a., Merck, Darmstadt, Njemačka

Natrijeva lužina, 4M, p.a., Merck, Darmstadt, Njemačka

Natrijev volframat, Merck, Darmstadt, Njemačka

Octena kiselina, koncentrirana, Merck, Darmstadt, Njemačka

Voda, redestilirana, Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu, Zagreb

Tablica 2. Princip uzorkovanja i pripreme bioloških uzoraka za GC/MS analizu

Uzorak	Medicinski pripravci (V/ μ L)			Mokraća (V=1 mL)	Serum (V=1 mL)	Metoda pripreme uzorka
	1	2	3			
1	25			+		LLE
2	50			+		LLE
3		25		+		LLE
4		50		+		LLE
5			25	+		LLE
6			50	+		LLE
7	25			+		SPE
8	50			+		SPE
9		25		+		SPE
10		50		+		SPE
11			25	+		SPE
12			50	+		SPE
13	25				+	LLE
14	50				+	LLE
15		25			+	LLE
16		50			+	LLE
17			25		+	LLE
18			50		+	LLE
19	25				+	SPE
20	50				+	SPE
21		25			+	SPE
22		50			+	SPE
23			25		+	SPE
24			50		+	SPE

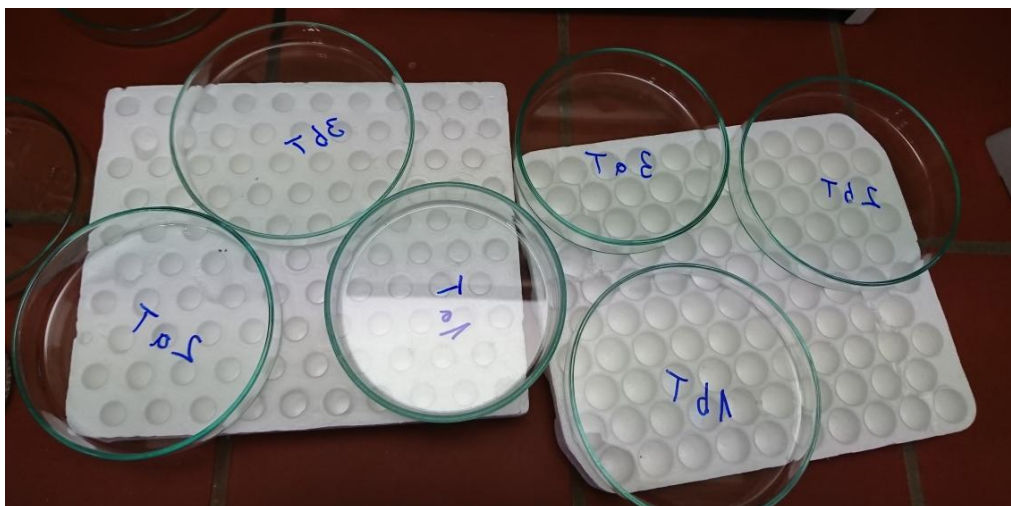
3.3. Postupci pripreme uzoraka za analizu

Uzorci medicinskih pripravaka su, u usporedbi s biološkim uzorcima, mnogo manje složeni, pa obrada tih uzoraka nekom od ekstrakcijskih metoda nije potrebna. Medicinski pripravci su, stoga, otopljeni i razrijeđeni u kloroformu te analizirani GC-MS instrumentalnom metodom.

24 pripremljena biološka uzorka podijeljena su u dvije istovjetne skupine po 12 uzoraka koji se unutar skupine međusobno razlikuju po tipu i koncentraciji medicinskog pripravka i mediju u kojem su pripremljeni (krv, mokraća). Jedna skupina uzoraka pripremljena je LLE ekstrakcijskom metodom, a druga SPE metodom pomoću različitih komercijalnih kolona za ekstrakciju. Analizirani biološki uzorci dokazano su negativni na prisustvo lijekova i sredstava ovisnosti, što je potvrđeno GC/MS analizom. Također, skupini određenoj za analizu LLE metodom pridodan je i kontrolni uzorak (slijepa proba), tj. uzorak mokraće u koji nije dodan niti jedan od tri medicinska pripravka.

3.3.1. Postupak pripreme za analizu LLE metodom

Za analizu bioloških uzoraka pripremljena je „in house“ LLE tehnika. Tubice za ekstrakciju pripremljene su dodatkom 1,8 g natrijeva volframata dihidrata i 3 mL smjese diklormetan/etilacetat (v/v=3:1). Svi uzorci mokraće i seruma s dodanim različitim volumenima medicinskih pripravaka zaluženi su sa 150 µL 4M natrijeve lužine. Nakon 30 min na sobnoj temperaturi dodano je 200 µL koncentrirane octene kiseline i 2 mL acetatnog pufera (pH=4). Otopina je zatim prebačena u pripremljene tubice za ekstrakciju. Uzorci su ekstrahirani na rotoru za ekstrakciju 10 min (50 rpm) te centrifugirani 15 min (2600 okretaja/min). 2,5 mL organske faze je izdvojeno u petrijevu zdjelicu te evaporirano u digestoru do suha (slika 4). Uzorci su otopljeni i razrijeđeni u kloroformu do konačnog volumena od 30 µL te prebačeni u staklene tubice za GC/MS analizu.



Slika 4. Dio ispitivanih uzoraka na sušenju u digestoru

3.3.2. Postupak pripreme za analizu SPE metodom

Postupak ekstrakcije čvrstom fazom vršio se pomoću komercijalnih kolona za SPE, Bond Elut Certify tvrtke Agilent Technologies, SAD Supelco, preko Visiprep vakuum kade za ekstrakciju (slika 5). Kolone su kondicionirane s 1 mL fosfatnog pufera (pH=6,90). Uzorak je propušten kroz kolonu polagano pod niskim tlakom (5 mm Hg). Kolona je zatim isprana s 1 mL destilirane vode, te je ostavljena na sušenju 1 minutu, nakon čega je provedena elucija metanolom. Metanol je u struji dušika isparen do suha, a suha tvar je otopljena u 30 μ L kloroforma te smještena u staklene tubice za GC/MS analizu.



Slika 5. Vakuum kada za ekstrakciju

3.4. Instrumentalna analiza GC-MS metodom

Uzorci su analizirani korištenjem plinskog kromatografa sa spektrometrom masa, Shimadzu GCMS-QP2010 (slika 6). Korištena je kapilarna kolona plinskog kromatografa Restek, RTx-5MS, dužine 30 m, promjera 0,25 mm i debljine filma nepokretne faze 0,25 μm . Ukupan rad instrumenta i obrada podataka kontrolirani su GCMS Solution računalnim programom.

3.4.1. Radni uvjeti GC-MS kromatografske kolone

Kromatografska analiza pripremljenih uzoraka izvedena je na plinskom kromatografu sa spektrometrom masa metodom koja omogućava istovremeno snimanje ukupnog ionskog kromatograma (engl. *Total Ion Chromatogram, TIC*) u području od 40 – 600 m/z i snimanje samo odabranih iona (engl. *Single ion monitoring, SIM*). Optimiran je temperaturni program.

Optimalni radni uvjeti:

- volumen injektiranja: 1 μ L (splitless)
- temperatura injektora 250 °C
- protok plina nosioca 1,0 mL/min

-ukupno trajanje temperaturnog programa: 20 minuta:

- I 100 °C izotermno 0,5 min
- II 5 °C /min do 220 °C
- III 275 °C izotermno 5 min



Slika 6. Plinski kromatograf sa spektrometrom masa; Shimadzu GCMS-QP2010

4. REZULTATI

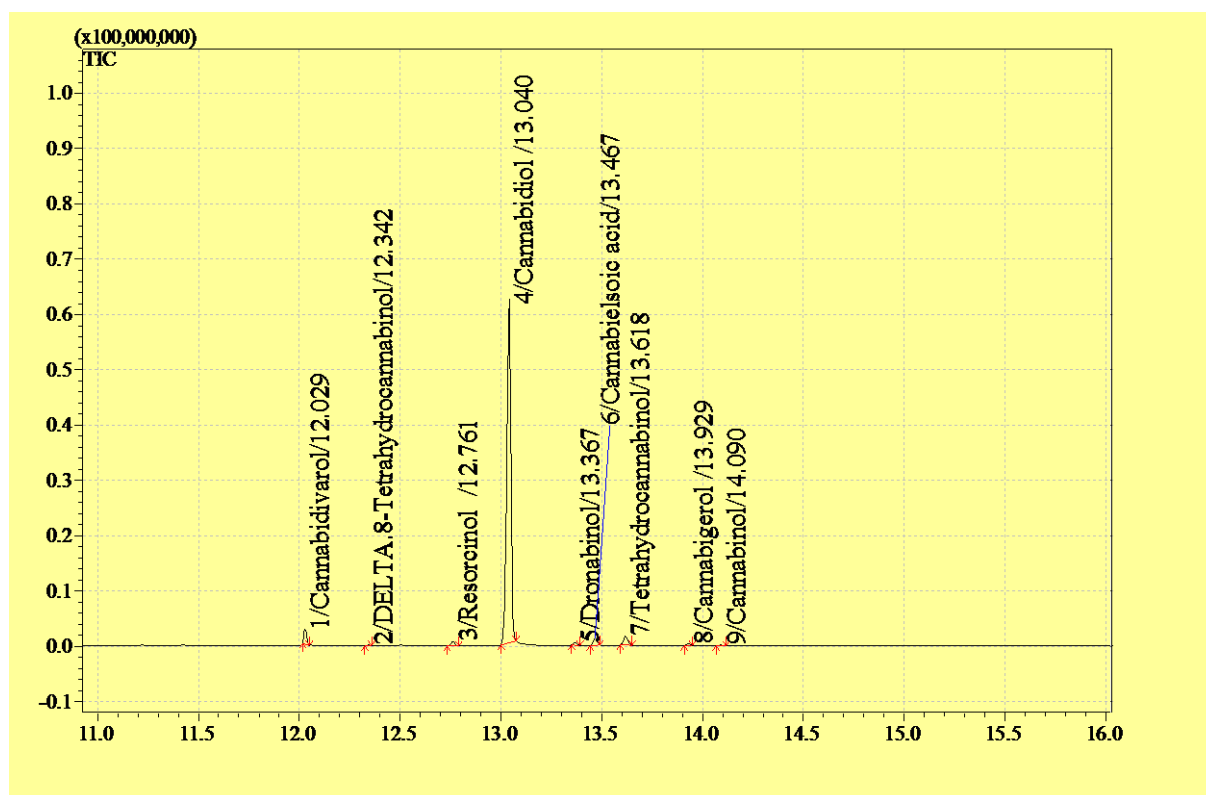
Analizom 3 medicinska pripravka i 24 biološka uzorka, pripravljena dodavanjem medicinskih pripravaka u uzorke mokraće i seruma, koji su dali negativan rezultat na prisustvo lijekova i sredstava ovisnosti, dokazano je prisustvo THC-a i nekolicine drugih kanabinoida u ispitivanim uzorcima. U medicinskom pripravku 1 dokazano je prisustvo osam kanabinoida i rezorcinola, a u medicinskim uzorcima 2 i 3 trinaest kanabinoida i rezorcinola. U svim analiziranim uzorcima, medicinskim pripravcima i u biološkim uzorcima, detektiran je kanabidiol (CBD), dok je tetrahidrokanabinol (THC) pronađen u svim uzorcima medicinskih pripravaka 2 i 3. Analizom medicinskog pripravka 1 THC nije detektiran u nijednom ispitivanom uzorku mokraće kao ni u dva uzorka seruma pripremljena za instrumentalnu analizu LLE ekstrakcijskom metodom.

4.1. Kvalitativna identifikacija kanabinoida u medicinskim pripravcima

Od tri ispitivana uzorka medicinskih pripravaka, u medicinskom pripravku 1 pronađeno je devet, a u medicinskim pripravcima 2 i 3 po četrnaest tvari od interesa. U svim pripravcima detektirano je prisustvo kanabidivarola, Δ -8-tetrahidrokanabinola, rezorcinola, kanabidiola, dronabinola, kanabielsoične kiseline, tetrahidrokanabinola, kanabigerola i kanabinola, dok su u pripravcima 2 i 3 pronađeni još i 3-propil- Δ -9-tetrahidrokanabinol, kanabicitrolol, 3-propilkanabinol, kanabikumaronon i tetrahidrokanabinol- Δ -9-acetat.

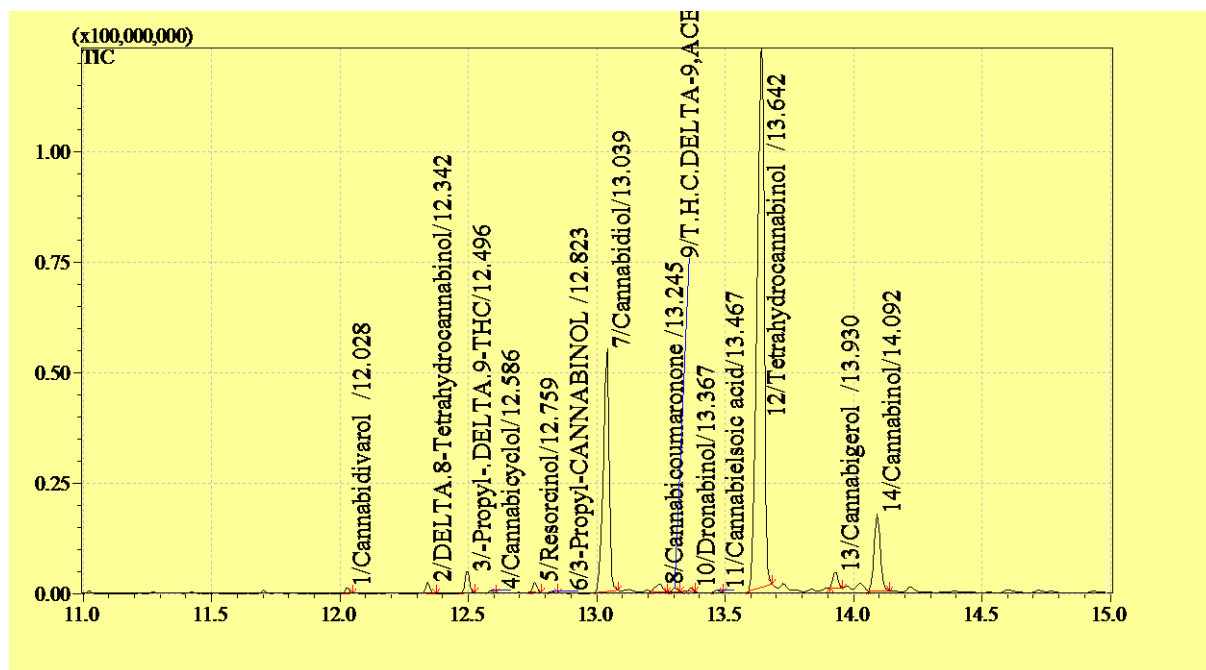
Na slikama 7-9 prikazani su ukupni ionski kromatogrami dobiveni GC/MS analizom medicinskih pripravaka 1, 2 i 3. Pronađene tvari zabilježene su na svojim karakterističnim retencijskim vremenima (RT). S obzirom da se rezultati ove studije baziraju na kvalitativnim analizama, nije promatrana visina pika na kromatogramu već samo karakteristična retencijska vremena kemijskih spojeva koji su uspoređivani s onima iz biblioteke. Sve ukupne ionske kromatograme karakterizira os x, kojom je prikazano vrijeme zadržavanja uzorka u koloni (retencijsko vrijeme, RT), te os y, kojom je prikazan intenzitet tvari proporcionalan njenoj koncentraciji.

U ispitivanom medicinskom pripravku 1 dokazano je prisustvo devet tvari: kanabidivarol, Δ -8-THC, rezorcinol, kanabidiol, dronabinol, kanabielsoična kiselina, THC, kanabigerol i kanabinol, prikazano na slici 7.



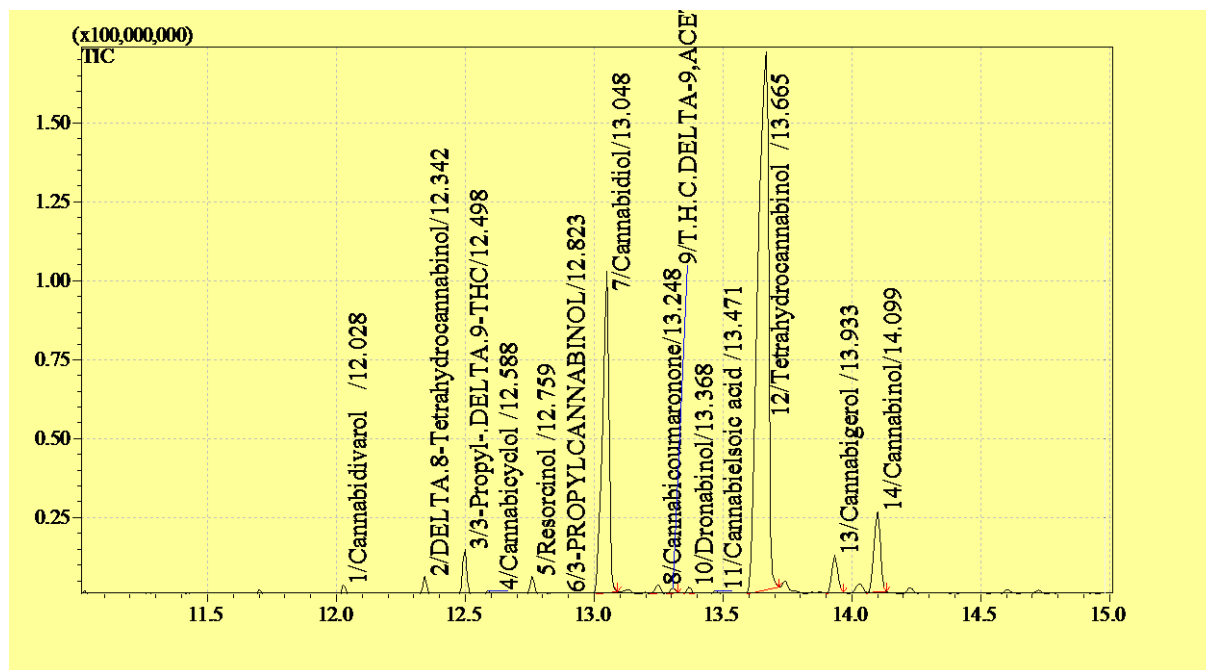
Slika 7. Uvećani prikaz dijela ukupnog ionskog kromatograma medicinskog pripravka br.1 analiziranog GC-MS tehnikom, s karakterističnim signalima i retencijskim vremenima za kanabidivarol (RT=12,029), Δ -8-THC (RT=12,342), rezorcinol (RT=12,761), kanabidiol (RT=13,040), dronabinol (RT=13,367), kanabielsoičnu kiselinu (RT=13,467), THC (RT=13,618), kanabigerol (RT=13,929) i kanabinol (RT=14,090).

U ispitivanom medicinskom pripravku 2 dokazano je prisustvo 14 tvari: kanabidivarol, Δ -8-THC, 3-propil- Δ -9-THC, kanabikiklol, rezorcinol, 3-propil-kanabinol, kanabidiol, kanabikumaronon, THC- Δ -9-acetat, dronabinol, kanabielsoična kiselina, THC, kanabigerol i kanabinol, prikazano na slici 8.



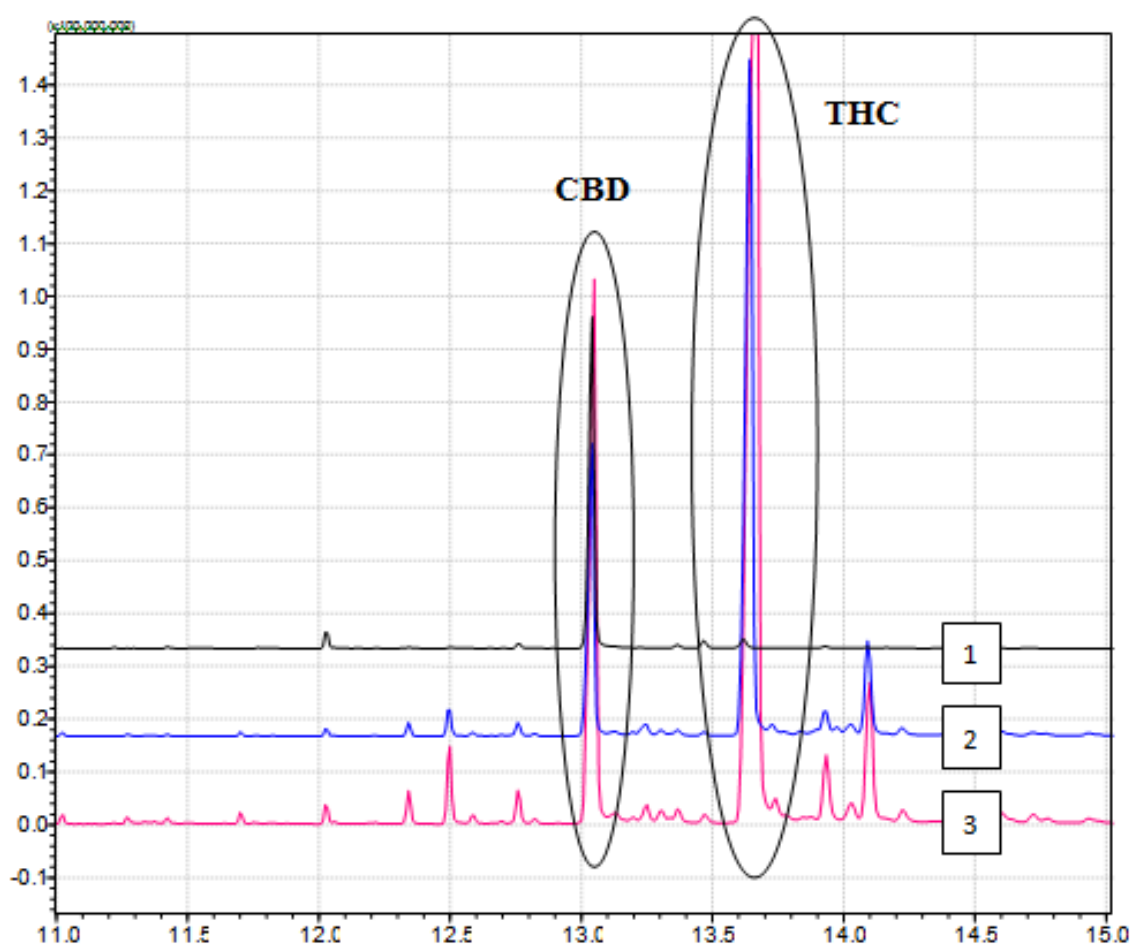
Slika 8. Uvećani prikaz dijela ukupnog ionskog kromatograma medicinskog pripravka br.2 analiziranog GC-MS tehnikom, s karakterističnim signalima i retencijskim vremenima: kanabidivarol (RT=12,028), Δ -8-THC (RT=12,342), 3-propil- Δ -9-THC (RT=12,496), kanabikiklol (RT=12,586), rezorcinol (RT=12,759), 3-propil-kanabinol (RT=12,823), kanabidiol (RT=13,039), kanabikumaronon (RT=13,245), THC- Δ -9-acetat (RT=13,304), dronabinol (RT=13,367), kanabielsoična kiselina (RT=13,467), THC (RT=13,642), kanabigerol (RT=13,930) i kanabinol (RT=14,092).

U ispitivanom medicinskom pripravku 3 dokazano je prisustvo 14 tvari: kanabidivarol, Δ -8-THC, 3-propil- Δ -9-THC, kanabikiklol, rezorcinol, 3-propil-kanabinol, kanabidiol, kanabikumaronon, THC- Δ -9-acetat, dronabinol, kanabielsoična kiselina, THC, kanabigerol i kanabinol, prikazano na slici 9.



Slika 9. Uvećani prikaz dijela ukupnog ionskog kromatograma medicinskog pripravka br.3 analiziranog GC-MS tehnikom, s karakterističnim signalima i retencijskim vremenima: kanabidivarol (RT=12,028), Δ -8-THC (RT=12,342), 3-propil- Δ -9-THC (RT=12,498), kanabikiklol (RT=12,588), rezorcinol (RT=12,759), 3-propil-kanabinol (RT=12,823), kanabidiol (RT=13,048), kanabikumaronon (RT=13,248), THC- Δ -9-acetat (RT=13,305), dronabinol (RT=13,368), kanabielsoična kiselina (RT=13,471), THC (RT=13,665), kanabigerol (RT=13,933) i kanabinol (RT=14,099).

Usporedbom rezultata analize medicinskih pripravaka (slika 10) vidljivo je da je najveća koncentracija kanabinoida prisutna u medicinskom pripravku br. 3, a najmanja u medicinskom pripravku br. 1 u kojem je i detektiran najmanji broj kanabinoida što ne znači da su pronađeni kanabinoidi i jedini prisutni, već da su ostali prisutni u koncentraciji preniskoj za detekciju GC-MS metodom. Također, kromatogrami pokazuju dva vrlo izražena pika koji predstavljaju kanabidiol (CBD) i tetrahidrokanabinol (THC). Te dvije komponente su očekivano najzastupljeniji kanabinoidi u ovim pripravcima.



Slika 10. Usporedba tri kromatograma dobivena analizom tri različita medicinska pripravka (1, 2 i 3), analizirana GC/MS tehnikom (kromatogram označen brojem 1 - medicinski pripravak 1; kromatogram označen brojem 2 - medicinski pripravak 2; kromatogram označen brojem 3 - medicinski pripravak 3)

4.2. Kvalitativna identifikacija kanabinoida u biološkim uzorcima

Biološki uzorci, pripremljeni i obrađeni (navedeno u *Materijali i metode*), analizirani su GC-MS instrumentalnom metodom radi utvrđivanja optimalnije metode pripreme bioloških uzoraka (LLE, SPE) za identifikaciju kanabinoida u biološkim uzorcima. 24 uzorka su podijeljena u 2 istovjetne skupine od kojih je jedna skupina obrađena SPE, a druga LLE metodom. GC-MS instrumentalnom metodom provedena je kvalitativna analiza, a dobiveni rezultati prikazani su u tablicama 3 i 4.

Tablica 3. Rezultati analize uzoraka mokraće sa dodatkom medicinskih pripravaka kanabisa

MOKRAĆA	uzorak	medicinski pripravak	kanabidivarol	Δ -8-THC	3-propil- Δ -9-THC	kanabicitlrol	rezorcinol	3-propilkanabinol	kanabidiol	kanabikumaronon	THC- Δ -9-acetat	dronabinol	kanabielsoična k.	THC	kanabigerol	kanabinol
LLE	1	1(25 μ L)							+							
	2	1(50 μ L)							+							
	3	2(25 μ L)							+					+		+
	4	2(50 μ L)							+					+		+
	5	3(25 μ L)							+					+		+
	6	3(50 μ L)		+	+		+		+					+		+
SPE	7	1(25 μ L)							+							
	8	1(50 μ L)							+				+			
	9	2(25 μ L)							+					+	+	+
	10	2(50 μ L)							+					+	+	+
	11	3(25 μ L)		+	+		+		+					+	+	+
	12	3(50 μ L)		+	+		+		+					+	+	+

Tablica 4. Rezultati analize uzoraka seruma sa dodatkom medicinskih pripravaka kanabisa

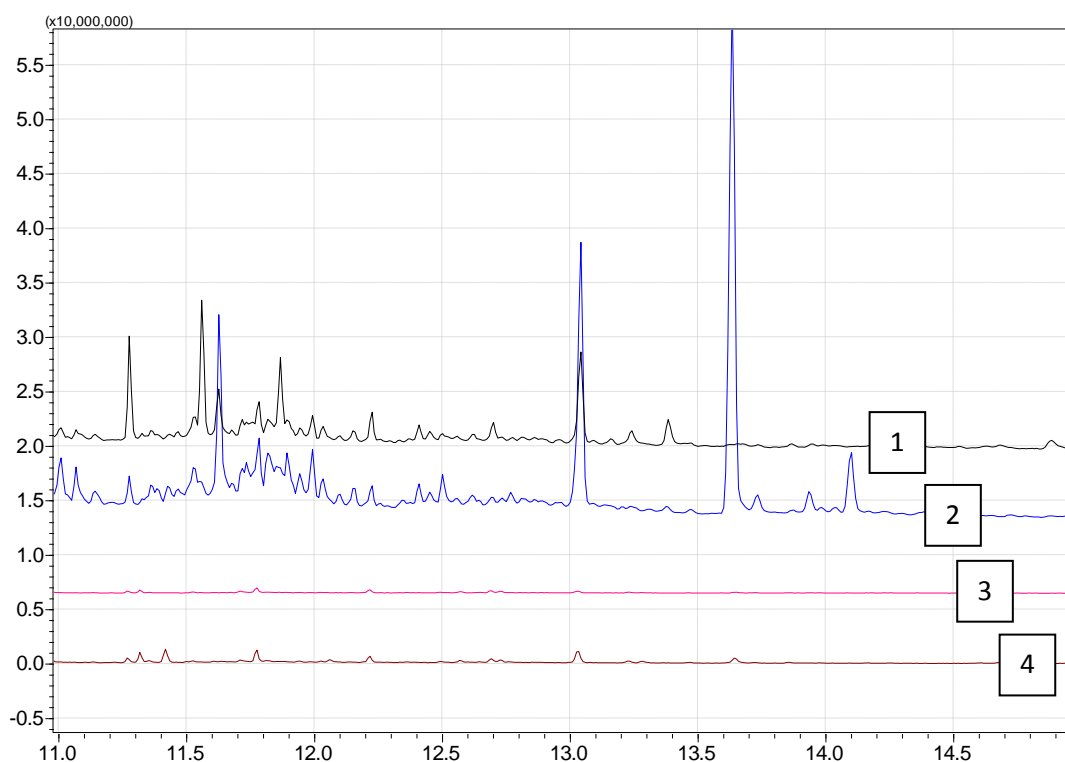
SERUM	uzorak	medicinski pripravak	kanabidirol	Δ -8-THC	3-propil- Δ -9-THC	kanabicitol	rezorcinol	3-propilkanabinol	kanabidiol	kanabikumaron	THC- Δ -9-acetat	dronabinol	kanabielsoična k.	THC	kanabigerol	kanabinol
LLE	1	1(25 μ L)							+							
	2	1(50 μ L)							+							
	3	2(25 μ L)							+					+		
	4	2(50 μ L)							+					+		+
	5	3(25 μ L)							+					+		+
	6	3(50 μ L)		+	+		+		+			+		+	+	+
SPE	7	1(25 μ L)							+					+		
	8	1(50 μ L)							+				+	+		
	9	2(25 μ L)							+					+	+	+
	10	2(50 μ L)		+	+		+		+			+	+	+	+	+
	11	3(25 μ L)							+					+	+	+
	12	3(50 μ L)	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+

Iz prikazanih tablica vidljivo je da je u svim uzorcima uspješno dokazano prisustvo CBD-a, dok je THC detektiran u svim uzorcima pripremljenim koristeći medicinske pripravke 2 i 3. U uzorcima u koje je dodan medicinski pripravak 1, THC je detektiran jedino nakon predobrade uzorka SPE metodom, i to isključivo u serumu. 3-propilkanabinol nije detektiran u niti jednom ispitivanom biološkom uzorku.

Na slikama 11-16 prikazana je usporedba kromatograma dobivenih GC/MS analizom bioloških uzoraka pripremljenih za analizu različitim metodama ekstrakcije. Međusobno se uspoređuju kromatogrami dobiveni analizom bioloških uzoraka u koje je dodan isti medicinski pripravak u dvije različite koncentracije (25 i 50 μ L), a koji su obrađeni različitim ekstrakcijskim metodama, s ciljem utvrđivanja optimalnije metode za pripremu uzoraka za analizu kanabinoide u biološkim uzorcima. Tvari od interesa zabilježene su na kromatogramu na svojim karakterističnim retencijskim vremenima (RT) koja su prikazana na osi x, a

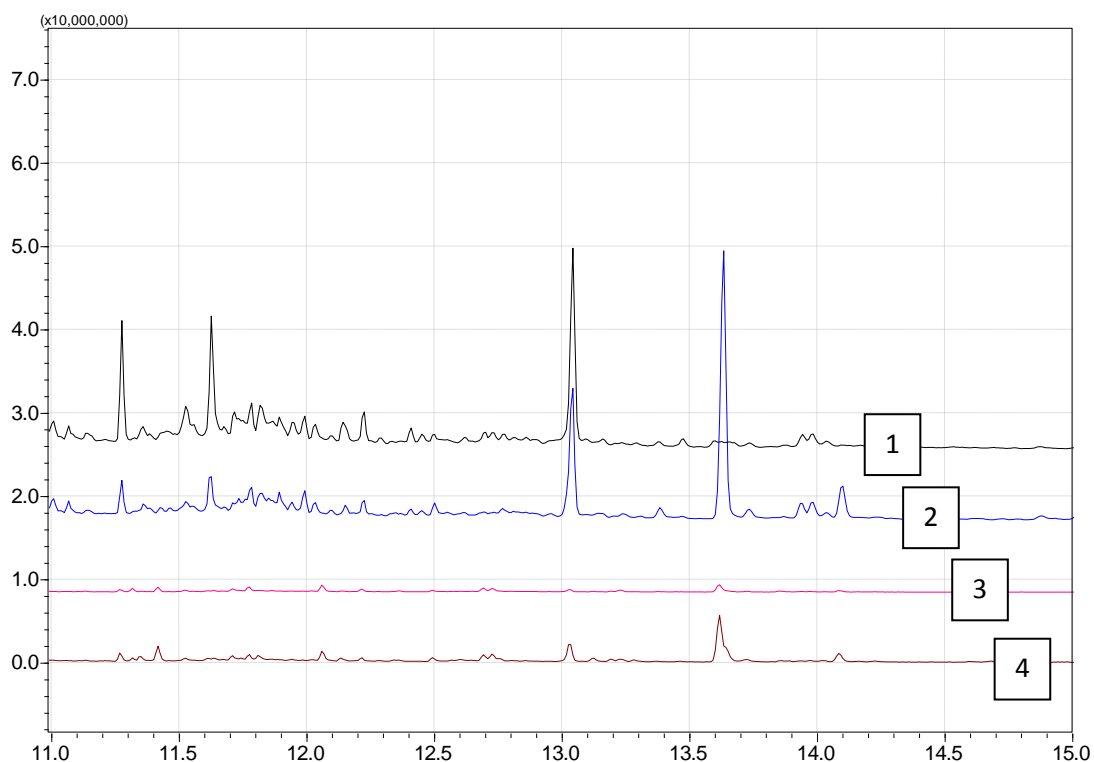
kromatogrami su uspoređivani na osnovu razlike u intenzitetu tih tvari koji je proporcionalan njihovoj koncentraciji u ispitivanom uzorku, a predstavljen je na osi y kromatograma.

Iz prikazanih grafova vidljivo je da su uzorci pripremljeni za analizu SPE metodom dali mnogo izraženije odzive na kromatogramu za kanabinoide (vrijedi i za uzorke u mokraći i u serumu). Također, korištenjem SPE metode dokazano je i prisustvo većeg broja tvari dokazanih u medicinskim pripravcima.



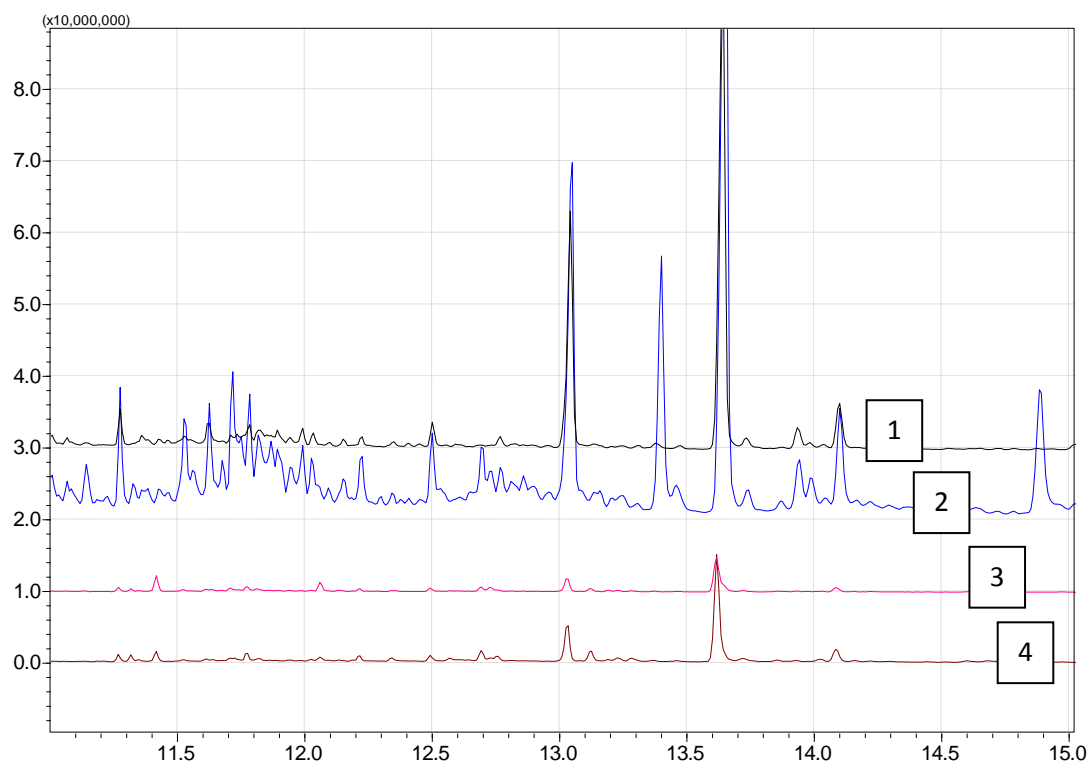
Slika 11. Usporedba četiri kromatograma (označeni brojevima 1-4) dobivenih analizom bioloških uzoraka mokraće uz dodatak medicinskog pripravka br. 1, koristeći obje ekstrakcijske tehnike:

- 1) biološki uzorak mokraće s 25 μ L medicinskog pripravka br. 1 pripremljen SPE metodom
- 2) biološki uzorak mokraće s 50 μ L medicinskog pripravka br. 1 pripremljen SPE metodom
- 3) biološki uzorak mokraće s 25 μ L medicinskog pripravka br. 1 pripremljen LLE metodom
- 4) biološki uzorak mokraće s 50 μ L medicinskog pripravka br. 1 pripremljen LLE metodom



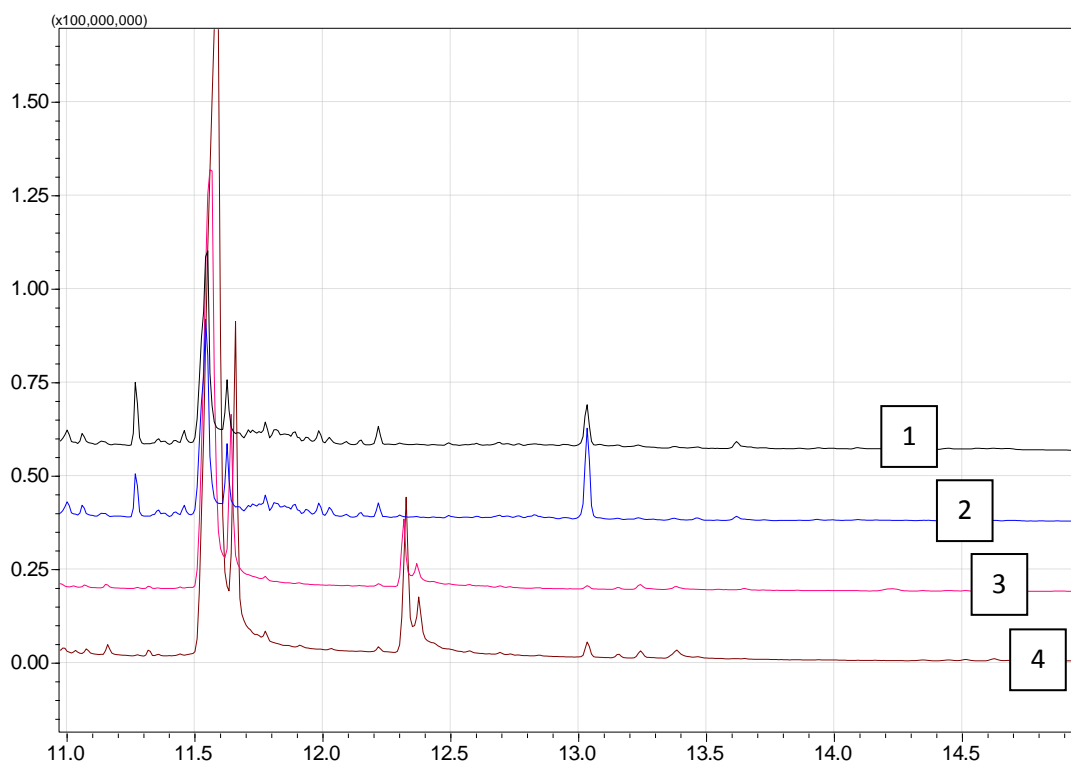
Slika 12. Usporedba četiri kromatograma (označeni brojevima 1-4) dobivenih analizom bioloških uzoraka mokraće uz dodatak medicinskog pripravka br. 2, koristeći obje ekstrakcijske tehnike:

- 1) biološki uzorak mokraće s 25 μ L medicinskog pripravka br. 2 pripremljen SPE metodom
- 2) biološki uzorak mokraće s 50 μ L medicinskog pripravka br. 2 pripremljen SPE metodom
- 3) biološki uzorak mokraće s 25 μ L medicinskog pripravka br. 2 pripremljen LLE metodom
- 4) biološki uzorak mokraće s 50 μ L medicinskog pripravka br. 2 pripremljen LLE metodom



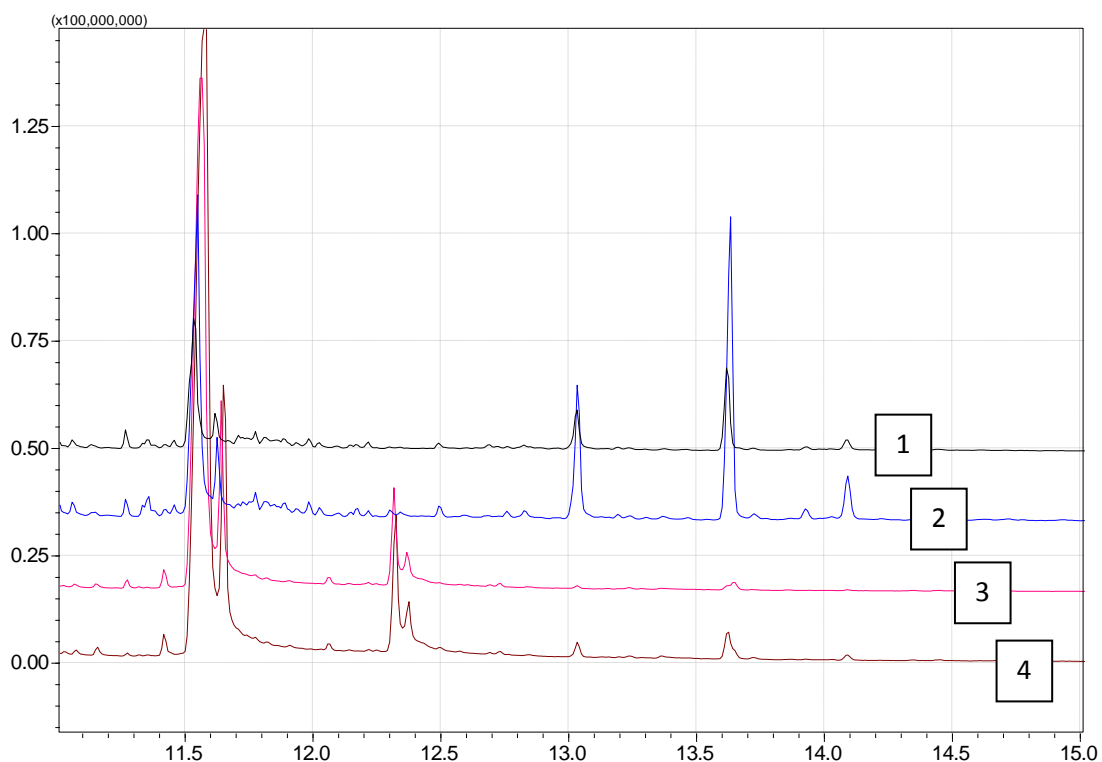
Slika 13. Usporedba četiri kromatograma (označeni brojevima 1-4) dobivenih analizom bioloških uzoraka mokraće uz dodatak medicinskog pripravka br. 3, koristeći obje ekstrakcijske tehnike:

- 1) biološki uzorak mokraće s 25 μ L medicinskog pripravka br. 3 pripremljen SPE metodom
- 2) biološki uzorak mokraće s 50 μ L medicinskog pripravka br. 3 pripremljen SPE metodom
- 3) biološki uzorak mokraće s 25 μ L medicinskog pripravka br. 3 pripremljen LLE metodom
- 4) biološki uzorak mokraće s 50 μ L medicinskog pripravka br. 3 pripremljen LLE metodom



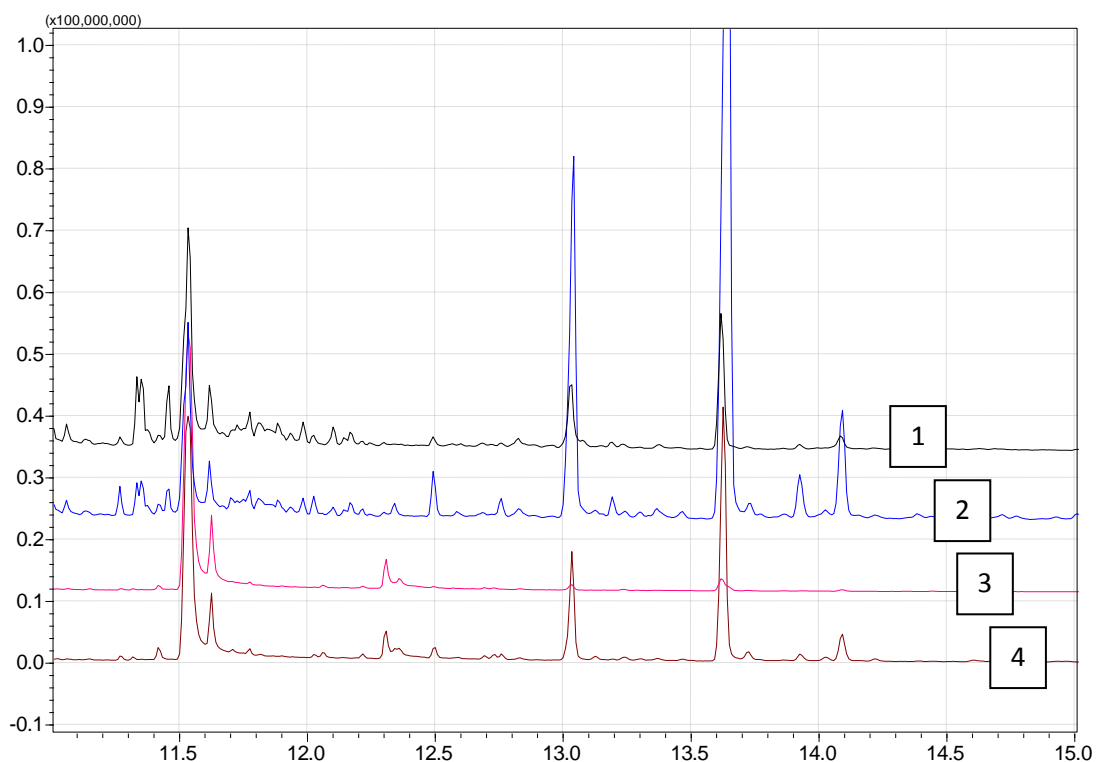
Slika 14. Usporedba četiri kromatograma (označeni brojevima 1-4) dobivenih analizom bioloških uzoraka seruma uz dodatak medicinskog pripravka br. 1, koristeći obje ekstrakcijske tehnike:

- 1) biološki uzorak seruma s 25 μ L medicinskog pripravka br. 1 pripremljen SPE metodom
- 2) biološki uzorak seruma s 50 μ L medicinskog pripravka br. 1 pripremljen SPE metodom
- 3) biološki uzorak seruma s 25 μ L medicinskog pripravka br. 1 pripremljen LLE metodom
- 4) biološki uzorak seruma s 50 μ L medicinskog pripravka br. 1 pripremljen LLE metodom



Slika 15. Usporedba četiri kromatograma (označeni brojevima 1-4) dobivenih analizom bioloških uzoraka seruma uz dodatak medicinskog pripravka br. 2, koristeći obje ekstrakcijske tehnike:

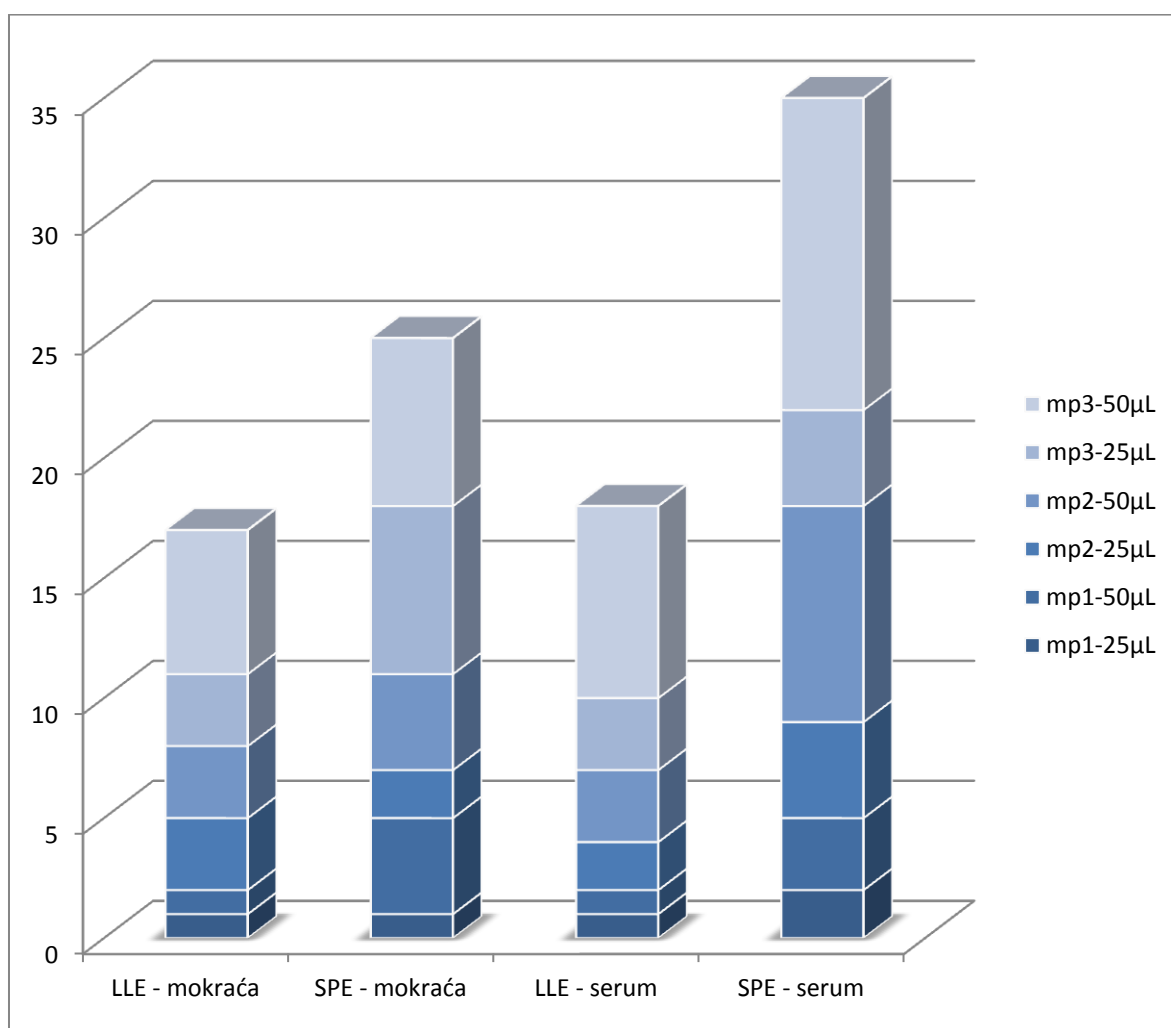
- 1) biološki uzorak seruma s 25 μ L medicinskog pripravka br. 2 pripremljen SPE metodom
- 2) biološki uzorak seruma s 50 μ L medicinskog pripravka br. 2 pripremljen SPE metodom
- 3) biološki uzorak seruma s 25 μ L medicinskog pripravka br. 2 pripremljen LLE metodom
- 4) biološki uzorak seruma s 50 μ L medicinskog pripravka br. 2 pripremljen LLE metodom



Slika 16. Usporedba četiri kromatograma (označeni brojevima 1-4) dobivenih analizom bioloških uzoraka seruma uz dodatak medicinskog pripravka br. 3, koristeći obje ekstrakcijske tehnike:

- 1) biološki uzorak seruma s 25 μ L medicinskog pripravka br. 3 pripremljen SPE metodom
- 2) biološki uzorak seruma s 50 μ L medicinskog pripravka br. 3 pripremljen SPE metodom
- 3) biološki uzorak seruma s 25 μ L medicinskog pripravka br. 3 pripremljen LLE metodom
- 4) biološki uzorak seruma s 50 μ L medicinskog pripravka br. 3 pripremljen LLE metodom

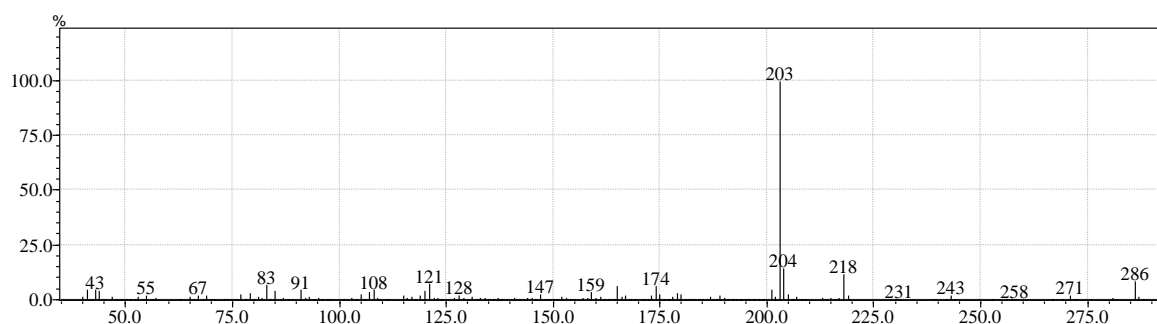
Grafičkim prikazom (Slika 17) prikazani su svi obrađeni biološki uzorci s dodatkom medicinskih pripravaka 1, 2 i 3, koristeći obje ekstrakcijske tehnike (SPE i LLE). Iz rezultata je vidljivo da je SPE metoda pokazala veću uspješnost pri identifikaciji kanabinoida u oba ispitivana medija, i u mokraći i u serumu, s tim da je analiza uzoraka seruma dala bolje rezultate od analize uzoraka mokraće.



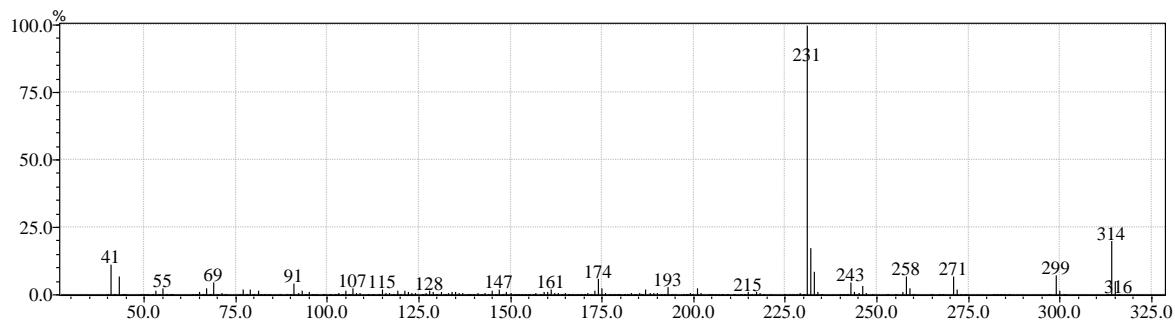
Slika 17. Grafički prikaz zbroja identificiranih kanabinoida po metodi ekstrakcije uzorka (LLE, SPE), u biološkim uzorcima mokraće i seruma s dodatkom različitog volumena medicinskih pripravaka 1, 2 i 3

4.3. Spektri masa tvari određenih u ispitivanim medicinskim pripravcima

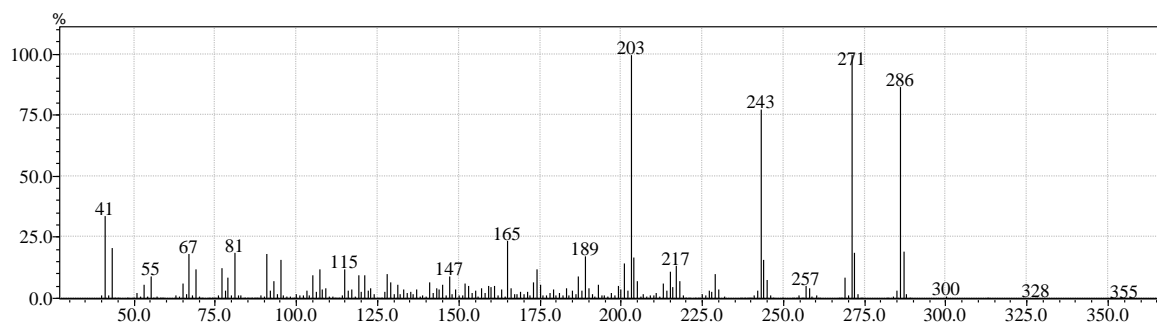
Na slikama 18-31 prikazani su spektri masa dobiveni masenim spektrometrom za detektirane tvari. Os x prikazuje vrijednost odnosa mase i naboja dok os y prikazuje njihov intenzitet. Usporedbom dobivenih spektara sa spektrima pohranjenim u bazama podataka (bibliotekama) identificirano je 14 kemijskih spojeva koji su prisutni u ispitivanim medicinskim pripravcima.



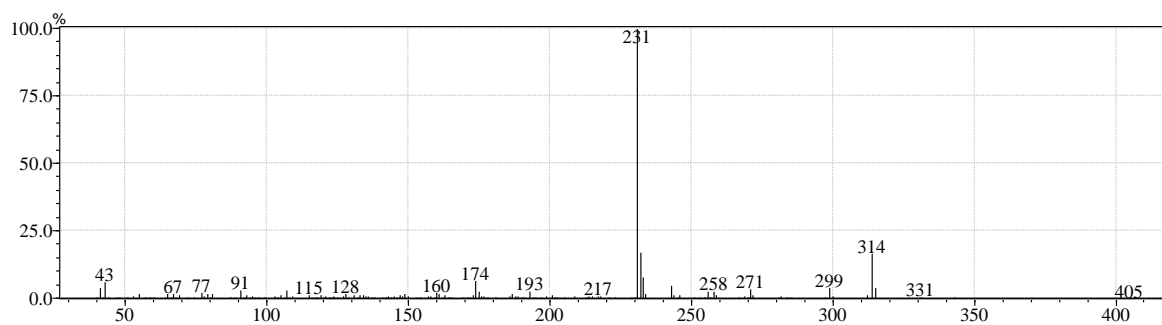
Slika 18. Karakterističan spektar masa za kanabidivariol (m/z 203, 204, 218, 286)



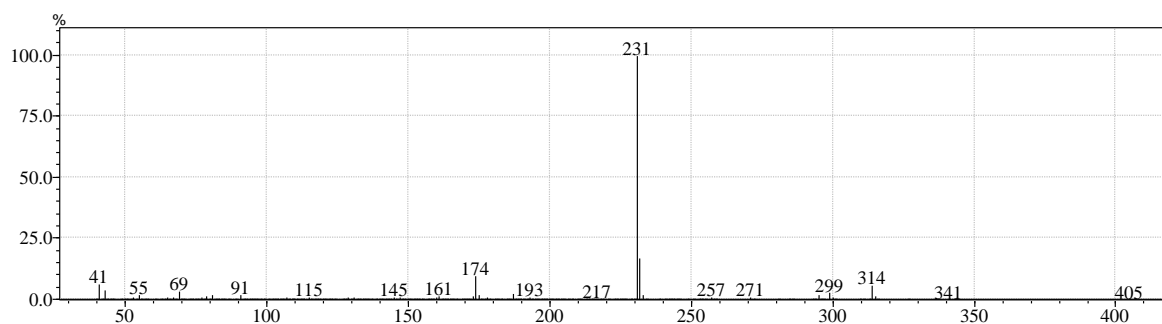
Slika 19. Karakterističan spektar masa za Δ -8-THC (m/z 231, 314, 258, 271)



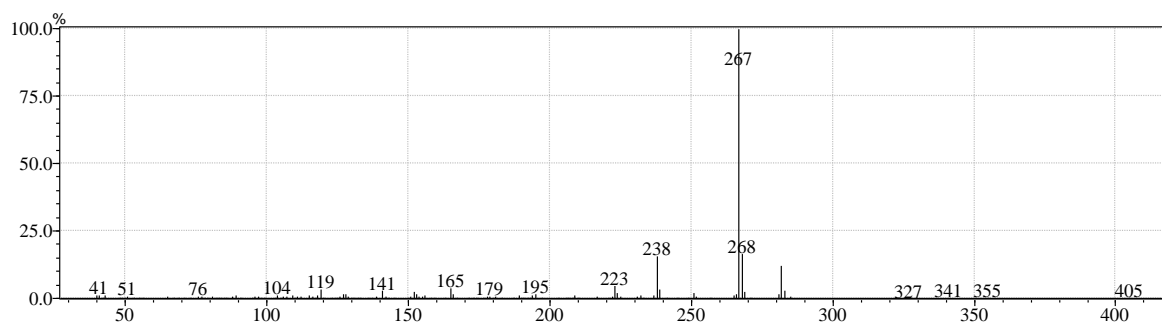
Slika 20. Karakterističan spektar masa za propil- Δ -9-THC (m/z 203, 271, 286, 243)



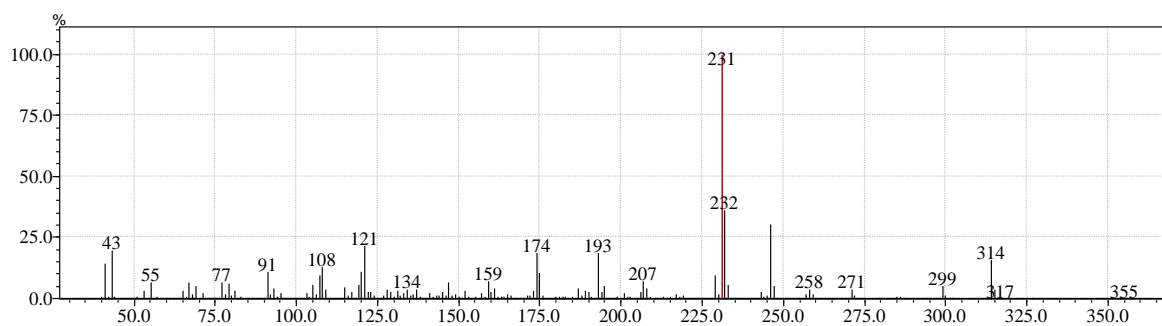
Slika 21. Karakterističan spektar masa za kanabicyklol (m/z 231, 314, 232, 174)



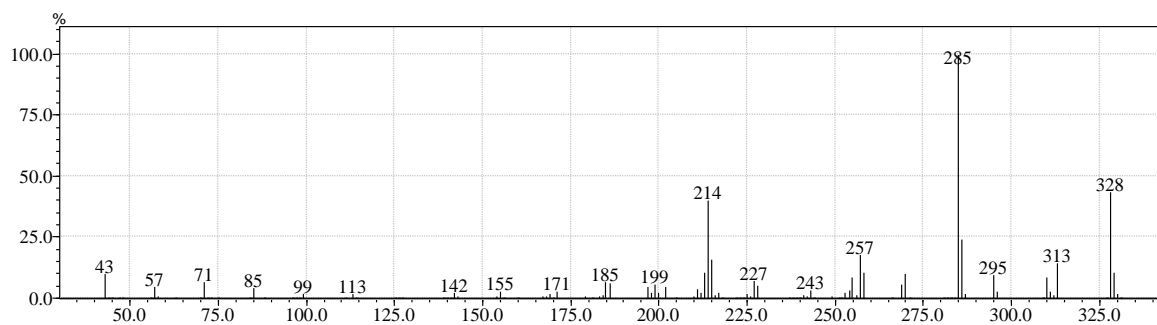
Slika 22. Karakterističan spektar masa za rezorcinol (m/z 231, 174, 314, 41)



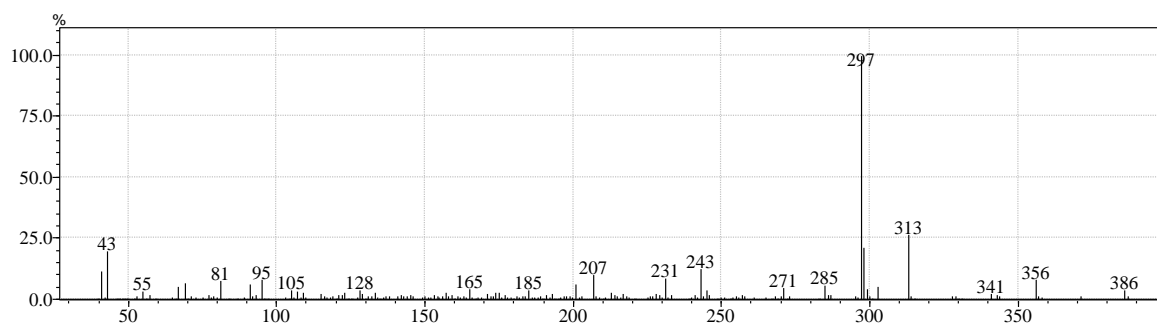
Slika 23. Karakterističan spektar masa za 3-propil-kanabinol (m/z 267, 268, 238)



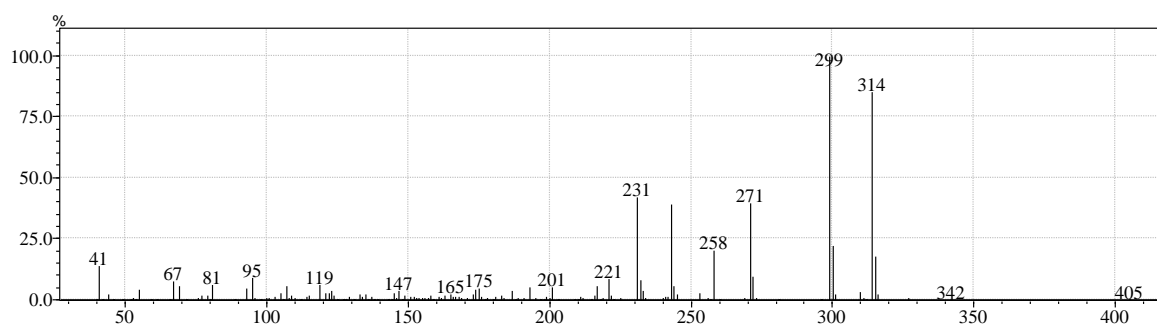
Slika 24. Karakterističan spektar masa za kanabidiol (m/z 231, 314, 232, 174)



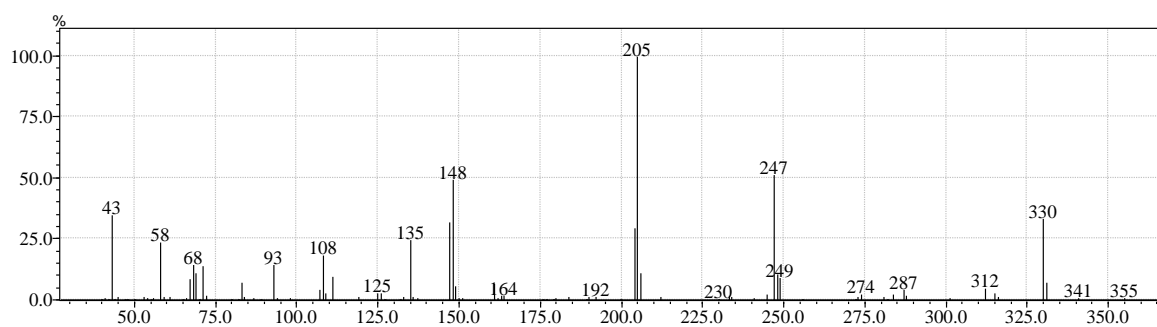
Slika 25. Karakterističan spektar masa za kanabikumaronon (m/z 285, 328, 214, 257)



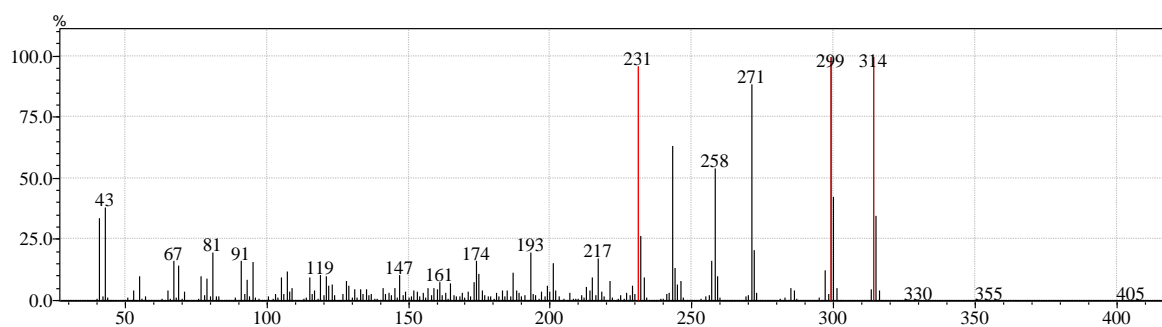
Slika 26. Karakterističan spektar masa za THC-Δ-9-acetat (m/z 297, 313, 43, 243)



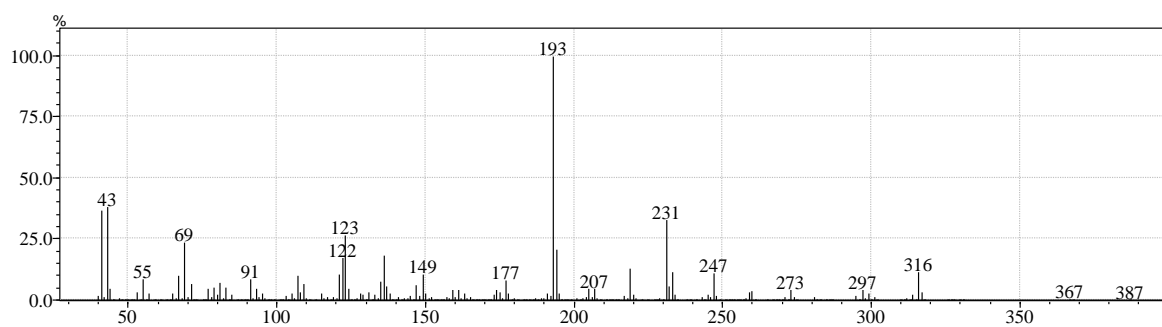
Slika 27. Karakterističan spektar masa za dronabinol (m/z 299, 314, 231, 271)



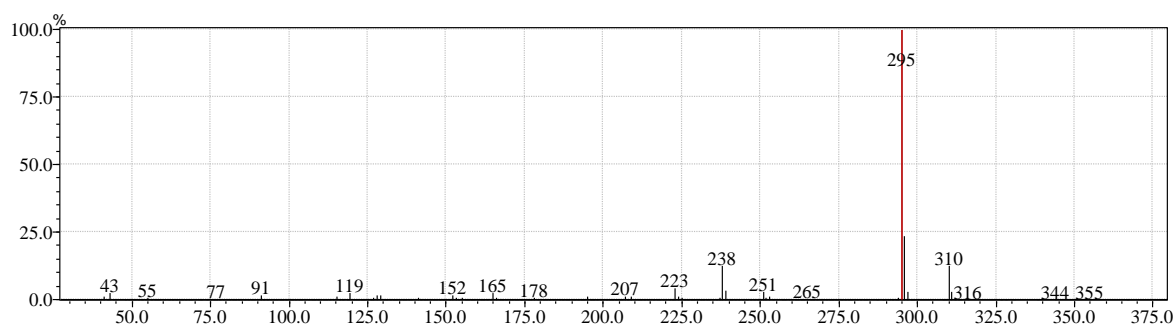
Slika 28. Karakterističan spektar masa za kanabielsoičnu kiselinu (m/z 205, 247, 148, 330)



Slika 29. Karakterističan spektar masa za tetrahidrokanabinol (m/z 299, 314, 231, 271)



Slika 30. Karakterističan spektar masa za kanabigerol (m/z 193, 43, 41, 231)



Slika 31. Karakterističan spektar masa za kanabinol (m/z 295, 296, 238, 310)

5. RASPRAVA

U posljednje vrijeme bilježi se nagli porast zanimanja farmaceutske industrije za proizvode kanabisa i razvoj širokog spektra medicinskih pripravaka, odnosno lijekova na bazi kanabisa za pacijente oboljele od multiple skleroze, karcinoma, najtežih oblika epilepsije i AIDS-a (13). Korištenje medicinskih pripravaka s različitim sadržajem i omjerom kanabinoida, dovelo je do uvođenja strogih zakonskih regulativa o istima, a time se javila i potreba za unaprjeđenjem analitičkih metoda za određivanje kanabinoida, što je ujedno i osnovni cilj ove eksperimentalne studije.

Kvalitativnom analizom uzoraka medicinskih pripravaka primjenom GC-MS metode dokazano je prisustvo ukupno 14 različitih kanabinoida od čega ih je 9 identificirano u medicinskom pripravku 1 (kanabidivarol, Δ -8-tetrahidrokanabinol, rezorcinol, kanabidiol, dronabinol, kanabielsoična kiselina, tetrahidrokanabinol, kanabigerol i kanabinol). Prisustvo svih 14 kanabinoida dokazano je u medicinskim pripravcima 2 i 3 (kanabidivarol, Δ -8-tetrahidrokanabinol, 3-propil- Δ -9-tetrahidrokanabinol, kanabiciklol, rezorcinol, 3-propilkanabinol, kanabidiol, kanabikumaronon, tetrahidrokanabinol- Δ -9-acetat, dronabinol, kanabielsoična kiselina, tetrahidrokanabinol, kanabigerol i kanabinol). Detektirani kanabinoidi su uspješno identificirani pomoću masenog spektrografa usporedbom dobivenih spektara masa (slike 11-24) sa spektrima masa iz baza podataka. Dobivenim rezultatima potvrđen je izbor kromatografske tehnike, GC-MS metode, za identifikaciju i određivanje kanabinoida, zbog čega se vodi kao najčešće korištena metoda u postupku analize kanabinoida (47).

U medicinskom pripravku 1 najveća površina ispod pika pripada kanabidiolu (CBD) dok su pikovi svih ostalih kanabinoida mnogo nižeg intenziteta, odnosno površine. Stoga se može zaključiti da je to pripravak s visokom koncentracijom CBD-a dok je THC slabo zastupljen. Neka novija istraživanja sugeriraju da je upravo CBD odgovoran za većinu terapijskih učinaka kanabisa (npr. neuroprotektivni, protuupalni, anksiolitički i antikonvulzivni učinak), dok se THC-u uglavnom pripisuju negativni psihotropni učinci na organizam pa se ovakvi pripravci javljaju sve češće (48). U medicinskim pripravcima 2 i 3 visokom površinom ispod pika ističu se pikovi koji predstavljaju CBD i THC, s time da je nešto veća površina pripada THC-u. To su pripravci čiji je omjer koncentracija THC/CBD približno jednak 1, odnosno pripravci koji sadrže približno jednake koncentracije THC-a i CBD-a, dok su svi ostali kanabinoidi prisutni u mnogo nižoj koncentraciji. Takav tip medicinskih pripravaka kanabisa je i dalje najzastupljenija vrsta pripravaka kanabisa u svijetu

i trenutno jedini dostupan tip za medicinsku primjenu u Hrvatskoj. Ti pripravci se, u Hrvatskoj i većini zemalja Europske Unije, preporučuju kao pomoćna terapija u liječenju multiple skleroze, karcinoma, epilepsije i AIDS-a (28).

Analiza bioloških uzoraka, s dodatkom medicinskih pripravaka, zahtijeva postupak preanalitičke pripreme za ekstrahiranje tvari od interesa iz matrice uzoraka, u kojima su prisutne kompleksne strukture koje mogu interferirati s analitom i onemogućiti njegovu detekciju. Cilj ove studije bio je utvrditi prikladniju ekstrakcijsku metodu za pripremu uzoraka krvi i mokraće u postupku analize kanabinoida GC-MS tehnikom. Korištene tehnike su ekstrakcija čvrstom fazom (SPE) i ekstrakcija tekuće-tekuće (LLE). Nakon pripreme uzoraka za analizu SPE ekstrakcijskom metodom, instrumentalnom analizom provedenom GC-MS tehnikom potvrđeno je prisustvo ukupno 25 kanabinoida u šest uzoraka mokraće, te 35 kanabinoida u šest uzoraka seruma. Nakon pripreme uzoraka za analizu LLE metodom detektirano je ukupno 17 kanabinoida u šest uzoraka mokraće i 18 kanabinoida u šest uzoraka seruma. CBD je detektiran u svim ispitivanim uzorcima, dok THC nije pronađen u šest od osam uzoraka koji su u sebi sadržavali medicinski pripravak 1, među kojima su četiri uzorka pripremljena za analizu LLE metodom i dva uzorka mokraće pripremljena za analizu SPE metodom. Razlog tome je niska koncentracija THC-a u samom medicinskom pripravku 1 što je prethodno utvrđeno analizom medicinskih pripravaka. Također, u nijednom ispitivanom biološkom uzorku nisu detektirani svi kanabinoidi koji su detektirani analizom medicinskih pripravaka (u niti jednom uzorku nije dokazano prisustvo 3-propilkanabinola) što je samo potvrda kako ne postoji ekstrakcijska metoda savršenog omjera raspodjele, odnosno, kako gubici postupkom ekstrakcije moraju postojati.

Usporedbom dobivenih kromatograma, analiziranih bioloških uzoraka s dodatkom medicinskih pripravaka, (slike 25-30) može se primijetiti kako su pikovi koji predstavljaju kanabinoide, posebice dva najizraženija koji se odnose na CBD i THC, nakon predobrade SPE metodom i do nekoliko puta veće površine od onih dobivenih nakon predobrade LLE metodom. Razlika u rezultatima među metodama dobro se vidi na slikama 25-30 promatrajući površinu ispod pika trećeg najzastupljenijeg kanabinoida, kanabinola ($RT=14,1$), inače važnog u analizi jer vremenom nastaje iz drugih kanabinoida pa je pokazatelj starosti pripravaka. Na slikama kromatograma (pri povećanju $\times 100,000,000$) dobivenih SPE metodom kanabinol je lako uočljiv u gotovo svim uzorcima, dok kod kromatograma nakon LLE, kanabinol je tek slabo primjetan kod uzoraka s dodatkom 50 μ L medicinskog pripravka 2, odnosno 3. Stoga se može zaključiti da je SPE metoda mnogo efikasnija metoda pripreme

uzoraka za analizu u kvalitativnoj analizi kanabinoida u biološkim uzorcima seruma i mokraće, sa mnogo manjim ekstrakcijskim gubicima analita u odnosu na LLE. Osim toga, utvrđene prednosti ove metode su i jednostavnost te brzina pripreme uzoraka za analizu, manji utrošak otapala i laka automatizacija procesa (35). Stoga je, između ovih dviju metoda, upravo SPE metoda izbora u pripremi bioloških uzoraka kanabinoida za analizu GC-MS tehnikom.

Ipak, usprkos dobrim rezultatima u detekciji kanabinoida, može se primijetiti da su, kod pripreme uzoraka SPE metodom, u većem broju i većeg intenziteta prisutni pikovi nekih drugih tvari koje nisu predmetom interesa u analizi (biološke komponente iz uzorka) pa je stoga i veća mogućnost njihove interferencije s kanabinoidima što može predstavljati značajan problem pri identifikaciji, a posebno kod kvantitativnih analiza kojima se određuje točna koncentracija ispitivanih komponenti. Takav je rezultat posebno interesantan jer je u suprotnosti s općeprihvaćenom teorijom kako upravo SPE metoda zbog visoke selektivnosti daje visoku reproducibilnost i čišće ekstrakte u odnosu na LLE. Ipak, može se zaključiti da nečistoće nisu prisutne u tolikoj mjeri da bi otežale detekciju kanabinoida u ovoj analizi te da je razlika u visini pikova kanabinoida između dviju metoda veća od razlike u intenzitetu pikova komponenti koje nisu od interesa, odnosno interferencija. Za kvantitativnu analizu kanabinoida u biološkim uzorcima nužno je provesti dodatna ispitivanja za utvrđivanje u kojoj mjeri nečistoće interferiraju i da li to utječe na konačan rezultat analize.

Također, ovom studijom analizirani su uzorci mokraće i seruma koji su sadržavali kanabinoide izravno dodane u biološke uzorke, negativne na prisustvo kanabinoida, što znači da sastav kanabinoida u uzorcima mokraće i seruma nije mogao odgovarati realnim biološkim uzorcima izuzetim nakon konzumacije nekog pripravka kanabisa. Kanabinoidi prisutni u tim uzorcima podlegli bi procesu metaboliziranja, odnosno strukturnoj izmijeni djelovanjem fizioloških procesa organizma pa je jasno da ova analiza ne može vjerno predstavljati analizu realnih bioloških uzoraka u kojima bi se detektirali pretežno metaboliti kanabinoida (većinom THC-OH i THC-COOH). Te molekule su mnogo polarnije od onih prisutnih u medicinskim pripravcima pa bi njihova ekstrakcija zahtijevala polarnija otapala (49). Daljnja ispitivanja bi stoga trebala uključivati i usporedbu ekstrakcijskih metoda u analizi realnih bioloških uzoraka kojima bi se dokazalo da li je, i u kojoj mjeri, SPE metoda u prednosti u odnosu na LLE metodu pri analizi realnih uzoraka te dolazi li do interferencija u takvim biološkim uzorcima.

6. ZAKLJUČCI

1. Analizom provedenom GC-MS tehnikom uspješno je dokazano prisustvo 14 različitih kanabinoida u medicinskim pripravcima kanabisa (9 u medicinskom pripravku 1, 14 u medicinskim pripravcima 2 i 3), među kojima su, najzastupljeniji, i za djelovanje na ljudski organizam najzaslužniji, THC i CBD.
2. CBD je detektiran u svim biološkim uzorcima, dok THC nije detektiran u šest uzoraka koji su u sebi sadržavali medicinski pripravak 1, među kojima su četiri uzorka pripremljena za analizu LLE metodom i dva uzorka mokraće pripremljena za analizu SPE metodom.
3. SPE metoda pokazala je veću učinkovitost u pripremi uzoraka za analizu od LLE metode. Nakon procesa obrade SPE metodom detektirano je ukupno 25 kanabinoida u šest uzoraka mokraće i 35 kanabinoida u šest uzoraka seruma. Nakon procesa obrade LLE metodom detektirano je ukupno 17 kanabinoida u šest uzoraka mokraće i 18 kanabinoida u šest uzoraka seruma.
4. Nedostatak SPE metode je u većem broju nečistoća koje u analizi mogu interferirati s analitom i otežati njegovu identifikaciju.
5. Potrebno je provesti detaljnija kvantitativna ispitivanja kako bi se utvrdilo u kojoj mjeri nečistoće interferiraju i da li to utječe na konačan rezultat analize.
6. Potrebno je provesti daljnja ispitivanja usporedbe ekstrakcijskih metoda u analizi realnih bioloških uzoraka za određivanje metabolita i za ispitivanje učinkovitosti korištenih metoda u kromatografskoj analizi metabolita kanabinoida.

7. POPIS CITIRANE LITERATURE

1. Williamson EM, Evans FJ. Cannabinoids in clinical practice. In: *Drugs*. 2000. p. 1303–14.
2. Adams IB, Martin BR. Cannabis: pharmacology and toxicology in animals and humans. *Addiction* [Internet]. 1996 Nov [cited 2017 Mar 6];91(11):1585–614. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8972919>
3. Mills JH. *Cannabis Britannica: Empire, Trade and Prohibition*. Oxford Univ Press. 2003;
4. Abel EL. *Marihuana: The First Twelve Thousand Years*. New York: Plenum Press; 1980. 126-131 p.
5. Mead AP. International Control of Cannabis. In: Pertwee RG, editor. *Handbook of Cannabis*. Oxford University Press; 2014. p. 44–65.
6. The World's Greatest Conference ever about Industrial Hemp – New president elected [Internet]. 2016 [cited 2017 Jan 1]. Available from: <http://news.bio-based.eu/the-worlds-greatest-conference-ever-about-industrial-hemp-new-president-elected/>
7. Grotenhermen F. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of cannabinoids. *Clin Pharmacokinet*. 2003;42(4):327–60.
8. Potter DJ. Growth and morphology of medicinal cannabis. In: Guy GW, Whittle BA, Robson PJ, editors. *The Medicinal Uses of Cannabis and Cannabinoids*. London: Pharmaceutical Press; p. 17–54.
9. Brenneisen R. Chemistry and Analysis of Phytocannabinoids and Other Cannabis Constituents. *Forensic Sci Med Marijuana Cannabinoids*. 2007;(7):17–49.
10. Russo EB. The Pharmacological History of Cannabis. In: *Handbook of Cannabis* [Internet]. Oxford: Oxford University Press; 2014. Available from: <http://www.oxfordscholarship.com/view/10.1093/acprof:oso/9780199662685.001.0001/acprof-9780199662685-chapter-2>
11. Hillig KW, Mahlberg PG. A chemotaxonomic analysis of cannabinoid variation in Cannabis (Cannabaceae). *Am J Bot*. 2004;91(6):966–75.
12. Hall W, Degenhardt L. Adverse health effects of non-medical cannabis use. *Lancet*

- [Internet]. 17AD Oct 23;374(9698):1383–91. Available from:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0140673609610370>
13. Pertwee RG, Cascio MG. Known Pharmacological Actions of Delta-9-Tetrahydrocannabinol and of Four Other Chemical Constituents of Cannabis that Activate Cannabinoid Receptors. In: Handbook of Cannabis. 2014. p. 148–64.
 14. THC structure. THC: Everything You Need To Know About Delta9-Tetrahydrocannabinol [Internet]. [cited 2017 Jan 26]. Available from:
<http://herb.co/2016/07/24/what-is-thc/>
 15. Fairbairn J, Liebmann J, Rowan M. The stability of cannabis and its preparations on storage. J Pharm Pharmacol. 1976;28:1–7.
 16. Turner SE, Williams CM, Iversen L, Whalley BJ. Molecular Pharmacology of Phytocannabinoids. Prog Chem Org Nat Prod. 2017;103:61–101.
 17. Sutlović D. Sredstva ovisnosti. In: Sutlović D, editor. Osnove forenzične toksikologije. Split: Redak; 2011. p. 71–3.
 18. Huestis M, Henningfield J, Cone E. Blood cannabinoids: I. absorption of THC and formation of 11-OH-THC and THCCOOH during and after smoking marijuana. J Anal Toxicol. 1992;16 (5):276–82.
 19. ElSohly MA, Slade D. Chemical constituents of marijuana: the complex mixture of natural cannabinoids. Life Sci. 2005;78(5):539–48.
 20. Thompson A, Langfield V. Development of Cannabis-Based Medicines: Regulatory Hurdles/Routes in Europe and the United States. In: Pertwee RG, editor. Handbook of Cannabis. Oxford University Press; 2014. p. 356–60.
 21. Pertwee RG. Prescribing cannabinoids for multiple sclerosis: current issues. CNS Drugs. 1999;11(5):327–34.
 22. Wright S, Guy G. Licensed Cannabis-Based Medicines: Benefits and Risks. In: Pertwee RG, editor. Handbook of Cannabis. Oxford University Press; 2014. p. 373–81.
 23. Sativex Oromucosal Spray, Summary of Product Characteristics [Internet]. eMC. [cited 2017 Feb 22]. Available from: <https://www.medicines.org.uk/emc/medicine/23262>

24. U.S. Food and Drug Administration. Marinol (Dronabinol) Technical Sheet. Nda 18-651/s-021. 2004. p. 3.
25. Russo EB. Cannabinoids in the management of difficult to treat pain. *Ther Clin Risk Manag.* 2008;4(1):245–59.
26. Mišković M. Terapijski potencijal kanabinoida u neurološkim oboljenjima, diplomski rad. Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Sveučilište u Zagrebu. 2016.
27. Bilten Hrvatske ljekarničke komore 2015./16. [Internet]. [cited 2016 Dec 28]. Available from: http://www.hljk.hr/Portals/0/Users/009/09/9/Bilten_03-04-2015_web.pdf
28. Ministarstvo Zdravlja. Pravilnik o izmjenama i dopunama Pravilnika o mjerilima za razvrstavanje lijekova te o propisivanju i izdavanju lijekova na recept. Vlada RH; 2015.
29. Medicinski kanabis [Internet]. Imunološki zavod. 2016 [cited 2017 Feb 12]. Available from: <http://www.imz.hr/proizvodi/medicinski-kanabis/>
30. Riha B. Uzimanje uzoraka za toksikološke analize živih osoba. In: Sutlović D, editor. *Osnove forenzične toksikologije*. Split: Redak; 2011. p. 303–10.
31. Dargan P, Wood DM. Novel psychoactive substances: classification, pharmacology and toxicology. In: Academic Press/Elsevier. London; 2013.
32. Flanagan R. *Basic analytical toxicology*. Geneva; 1995.
33. Marchiotti I. Što bi liječnici školske medicine trebali znati o testiranju na ilegalne droge. *Hrvat časopis za javno Zdr* [Internet]. 2007;3(Vol 3, Broj 10). Available from: <http://hcjz.hr/index.php/hcjz/article/viewFile/2067/2040>
34. Ritter NM. Distinctions between Analytical and Bioanalytical Test Methods [Internet]. BioProcess International. 2011 [cited 2017 Jan 1]. Available from: <http://www.bioprocessintl.com/analytical/downstream-validation/distinctions-between-analytical-and-bioanalytical-test-methods-31823/>
35. Sutlović D. Analiza bioloških uzoraka. In: Sutlović D, editor. *Osnove forenzične toksikologije*. Split: Redak; 2011. p. 337–44.
36. Kaštelan-Macan M, Medić-Šarić M, Turina S. Uzorkovanje i priprava uzoraka. In:

Plošna kromatografija. Zagreb: Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu; 2006. p. 92–7.

37. Hennion M-C. Solid-phase extraction: method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography. *J Chromatogr A* [Internet]. 1999 Sep [cited 2017 Mar 13];856(1–2):3–54. Available from:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967399008328>
38. Poole CF. New trends in solid-phase extraction. *TrAC Trends Anal Chem* [Internet]. 2003 Jun [cited 2017 Mar 13];22(6):362–73. Available from:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165993603006058>
39. Cox M, Rydberg J. Introduction to Solvent Extraction. In: Rydberg J, Cox M, Musikas C, Choppin GR, editors. *Solvent Extraction Principles and Practice*. Second Edi. New York: Marcel Dekker, Inc.; 2004. p. 1–27.
40. Skoog DA, West DM, Holler FJ. Uvod u kromatografske metode. In: *Osnove analitičke kemije*. Školska knjiga; 1999. p. 645–74.
41. Veršić-Bratinčević M. Sredstva ovisnosti u biološkim uzorcima: određivanje i stabilnost, doktorska disertacija. Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu. 2015.
42. Tomašek L, Bakulić L. Kriminalističko istraživanje, zapljena i analiza sredstava ovisnosti. In: Sutlović D, editor. *Osnove forenzične toksikologije*. Split: Redak; 2011. p. 111–4.
43. Skoog DA, West DM, Holler FJ. Plinsko-tekućinska kromatografija. In: *Osnove analitičke kemije*. Školska knjiga; 1999. p. 674–92.
44. Pine SH. Organska kemija. Zagreb: Školska knjiga; 1994. 1130-1132 p.
45. GC-MS scheme [Internet]. [cited 2017 Jan 1]. Available from:
http://www.skz.de/media/www.skz.de/media/med_30352/108995_gc_ms_en.png
46. Riha B. Potvrдна analitička metoda, plinska kromatografija - spektrometrija masa. In: Sutlović D, editor. *Osnove forenzične toksikologije*. Split: Redak; 2011. p. 394–5.
47. Andrews RJ. Analysis of cannabinoids in post-mortem blood and hair – its value in

post-mortem toxicology A thesis submitted for the degree of Doctor of Philosophy ,
Imperial College London. 2013;

48. Fasinu PS, Phillips S, ElSohly MA, Walker LA. Current Status and Prospects for Cannabidiol Preparations as New Therapeutic Agents. *Pharmacotherapy*. 2016;36:781–796.
49. Lee R, Saussereau E, Lacroix C, Wood M. Quantitative Analysis of Cannabinoids in Whole Blood Using UPLC-MS / MS for Forensic Laboratories Sample description. :1–8.

8. SAŽETAK

NASLOV RADA:

Dokazivanje THC-a u medicinskim pripravcima i u biološkim uzorcima.

CILJEVI ISTRAŽIVANJA:

Kvalitativno dokazati prisutnost THC-a i ostalih kanabinoida u medicinskim pripravcima i u biološkim uzorcima primjenom GC-MS metode, usporediti rezultate analize dobivene nakon pripreme uzoraka različitim ekstrakcijskim metodama (ekstrakcija čvrstom fazom, SPE, i ekstrakcija tekuće-tekuće, LLE) te utvrditi koja je metoda prikladnija za pripremu uzoraka pri analizi kanabinoida.

USTROJ ISTRAŽIVANJA:

eksperimentalna studija

MJESTO ISTRAŽIVANJA:

Kemijsko-toksikološki laboratorij Kliničkog odjela za sudsku medicinu Zavoda za patologiju, sudsku medicinu i citologiju, Kliničkog bolničkog centra u Splitu.

MATERIJALI I METODE:

Tri medicinska pripravka koji sadrže THC otopljena su i razrijeđena u kloroformu te analizirana GC-MS instrumentalnom metodom kako bi se utvrdio njihov sastav. Zatim su, koristeći te pripravke, pripravljena 24 biološka uzorka, od toga 12 uzoraka s mokraćom i 12 uzoraka sa serumom. Uzorci su podijeljeni u dvije istovjetne skupine i svaka je za analizu pripremljena različitom ekstrakcijskom metodom, ekstrakcijom čvrstom fazom (SPE) ili ekstrakcijom tekuće-tekuće (LLE). Uzorci su otopljeni u malom volumenu kloroforma i analizirani na GC-MS uređaju metodom koja omogućava istovremeno snimanje ukupnog ionskog kromatograma (TIC) u području od 40 – 600 m/z i snimanje samo odabranih iona (SIM).

REZULTATI:

U medicinskom pripravku 1 detektirano je prisustvo devet, a u medicinskim pripravcima 2 i 3 četrnaest kanabinoida. Kanabidiol (CBD) je detektiran u svim analiziranim uzorcima, dok je tetrahidrokanabinol (THC) detektiran u svim uzorcima medicinskih pripravaka 2 i 3.

Analizom medicinskog pripravka 1, THC nije detektiran u nijednom ispitivanom uzorku mokraće kao ni u dva uzorka seruma pripremljena za instrumentalnu analizu LLE ekstrakcijskom metodom. Nakon pripreme uzoraka za analizu SPE metodom, analizom provedenom GC-MS tehnikom ukupno je detektirano 25 kanabinoida u šest uzoraka mokraće i 35 kanabinoida u šest uzoraka seruma, dok je nakon pripreme uzoraka za analizu LLE metodom ukupno detektirano 17 kanabinoida u šest uzoraka mokraće i 18 kanabinoida u šest uzoraka seruma. Uzorci pripremljeni za analizu SPE metodom dali su mnogo izraženije odzive na kromatogramu za kanabinoide od uzoraka pripremljenih za analizu LLE metodom.

ZAKLJUČAK:

Ekstrakcija čvrstom fazom (SPE) pokazala je veću učinkovitost u pripremi uzoraka za analizu, sa mnogo manjim ekstrakcijskim gubicima od ekstrakcije tekuće-tekuće (LLE), posebice kod analize kanabinoida iz uzoraka seruma. Nedostatak metode je u većem broju nečistoća koje u analizi mogu interferirati s analitom i otežati njegovu identifikaciju. Stoga je potrebno provesti detaljnija kvantitativna ispitivanja kako bi se utvrdilo u kojoj mjeri nečistoće interferiraju i da li to utječe na konačan rezultat analize.

9. SUMMARY

DIPLOMA THESIS TITLE:

Determination of THC in medical preparations and biological samples.

OBJECTIVES:

Qualitative determination of THC and other cannabinoids in medical preparations and biological samples using GC-MS method, comparison of the results obtained after sample preparation with different extraction methods (Solid phase extraction, SPE, and Liquid-liquid extraction, LLE) and defining the more appropriate extraction method for sample preparation in cannabinoid analysis.

DESIGN:

Experimental study

SETTINGS:

Laboratory of toxicology, Department of pathology, forensic medicine and cytology, University Hospital of Split.

MATERIALS AND METHODS:

Three medical preparations which contain THC were dissolved and diluted in chloroform and analyzed with GC-MS instrumental method in order to determine their composition. Then, that preparations were used to make 24 biological samples with different concentrations of cannabinoids, 12 samples of urine and 12 samples of serum. Samples were divided into two identical groups and each group was prepared for analysis using different extraction method, solid-phase extraction or liquid-liquid extraction. Samples were dissolved in a small volume of chloroform and analyzed with GC-MS method using mode that simultaneously records total ion chromatogram (TIC) in the area of 40-600 m/z and single ion monitoring (SIM) scanning mode.

RESULTS:

There was nine cannabinoids detected in medical preparation 1 and fourteen cannabinoids detected in medical preparations 2 and 3. Cannabidiol (CBD) was detected in all analyzed samples, and tetrahydrocannabinol (THC) was detected in all samples made using medical preparation 2 and 3. THC was not detected in any urine samples made using medical preparation 1 as well as in two serum samples prepared for analysis with LLE extraction and made using the same preparation. GC-MS analysis detected the presence of a total of 25 cannabinoids in six urine samples and 35 cannabinoids in six serum samples after sample preparation by SPE extraction method and also 17 cannabinoids in six urine samples and 18 cannabinoids in six serum samples after sample preparation by LLE extraction method. Samples prepared for analysis by the SPE method gave more pronounced responses on the chromatograms compared to samples prepared for analysis by the LLE method.

CONCLUSION:

SPE method showed greater efficacy in sample preparation for cannabinoid analysis of biological samples than liquid-liquid extraction, especially when analyzing serum samples. Disadvantage of SPE method is the greater amount of impurities present in the sample that can cause interferences with the analyte and make it more difficult to identify. Therefore, more detailed quantitative studies are needed to determine the extent to which the impurities interfere and whether that affects the final result of the analysis.

Hrvoje Vlašić rođen je 24. studenog 1992. godine u Šibeniku sa stalnim prebivalištem u Dubravi kod Tisna. S odličnim uspjehom završava Osnovnu školu „Tisno“ u Tisnom i Gimnaziju Antuna Vrančića u Šibeniku. U razdoblju od 2008. do 2011. godine četiri puta osvaja prva mjesta na županijskim natjecanjima iz kemije. Od 2011. godine studira na Integriranom preddiplomskom i diplomskom studiju farmacije u Splitu. Od ožujka do rujna 2016. godine odrađuje stručno osposobljavanje u Ljekarnama Splitsko-dalmatinske županije, u ljekarničkoj jedinici Brda.